

Université de Sherbrooke

Étude du rôle de la maturation du TGF β par la furine dans la tumorigénèse

par

Nancy Berger-Thibault

Département de pédiatrie, service d'immuno-allergologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.) en immunologie

13 avril 2007



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-31358-9

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-31358-9

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Université de Sherbrooke

Étude du rôle de la maturation du TGF β par la furine dans la tumorigénèse

par

Nancy Berger-Thibault

Département de pédiatrie, service d'immuno-allergologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.) en immunologie

13 avril 2007

Résumé :

Le TGF β est une cytokine anti-inflammatoire impliquée dans plusieurs types de cancer. Il joue le rôle à la fois de suppresseur de tumeurs et d'oncogène. En effet, selon le stade de progression de la tumeur, il peut avoir un effet protecteur ou promoteur de la tumorigénèse. Les mécanismes par lesquels le TGF β exerce ses fonctions dans la carcinogénèse ne sont pas bien compris. Il est important d'élucider ces mécanismes afin de pouvoir développer de nouveaux traitements permettant de contrer les effets tumorigéniques de ce facteur de croissance.

Le TGF β interagit avec une panoplie de facteurs au cours de son processus de maturation et d'activation. On compte parmi eux la furine, la plasmine, la thrombospondine, les intégrines et les métalloprotéases. Toutes ces molécules peuvent être impliquées dans les processus néoplasiques. L'étude du rôle de leurs interactions dans la tumorigénèse permettrait de mieux comprendre les effets du TGF β .

Une des cibles importantes de l'étude des interactions entre le TGF β et les acteurs de son processus de maturation et d'activation est la convertase de proprotéine furine. Cet enzyme est responsable de la maturation de plusieurs substrats impliqués dans le cancer tels que le TGF β , le VEGF, le PDGF, la MT1-MMP et l'IGF-1. La maturation de tous

ces composés favorise le développement des tumeurs et des métastases en augmentant la prolifération des cellules tumorales, leur capacité d'invasion et l'angiogénèse au cœur des tumeurs solides et des métastases. Le TGF β étant un substrat important de la furine, le but de ce projet est de caractériser le rôle de la maturation du TGF β par la furine dans la tumorigénèse.

Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de cellules cancéreuses humaines, les HT1080, et un modèle *in vivo* de progression tumorale chez les souris nu/nu. Nous avons déterminé par différentes techniques telles que la zymographie, les essais d'adhésion, les essais d'invasion sur matrice de collagène de type IV, les essais de motilité, l'incorporation de thymidine tritiée et le PCR quantitatif en temps réel, que la maturation du TGF β par la furine a un effet protecteur dans les phases précoces du développement tumoral et promoteur sur le développement plus tardif du cancer.

En fait, la maturation du TGF β par la furine permet de maintenir des concentrations plus élevées de TGF β bioactif dans l'environnement tumoral. Ceci permet l'inhibition de la prolifération cellulaire. Toutefois, cette forte présence de TGF β au niveau de la tumeur induit, par l'augmentation de l'adhésion et de la motilité cellulaire, la migration de type amoéboïde observée dans plusieurs stades de la tumorigénèse dont la dissémination lymphatique et l'extravasation. De plus, par la production de MMP-2 active et la formation d'invadopodes, le TGF β induit la migration de type mésenchymal surtout observée au début de l'invasion tumorale et au cours du processus d'intravasation. Par ailleurs, il nous a été impossible de déterminer le rôle exact de la maturation du TGF β par la furine sur l'angiogénèse, un facteur important dans le maintien des tumeurs solides volumineuses et des métastases. En fait, globalement, elle semble favoriser l'angiogénèse par l'expression de la furine et du VEGF, l'activation de la MT1-MMP et la maturation de la MMP-2, tous des facteurs pro-angiogéniques. Elle permet aussi l'induction de l'expression de PAI-1 qui est plutôt un facteur anti-angiogénique.

À l'aide d'un système de reconstitution de l'activité du TGF β chez les cellules dont la furine est inhibée, nous avons déterminé que le TGF β est fortement responsable des effets de la furine sur la tumorigénèse et ce, à plusieurs niveaux. Il est responsable de l'effet de la furine sur la prolifération, la production de MMP-2, l'invasion, le phénotype cellulaire et la transition d'une migration de type mésenchymal à une migration de type amoéboïde. Il est également partiellement impliqué dans le rôle de la furine sur la formation des invadopodes et la motilité cellulaire. Par contre, pour ces deux derniers processus et au niveau de l'adhésion cellulaire, d'autres substrats de la furine semblent nécessaire pour qu'elle accomplisse ses fonctions.

Mots clés : TGF β , furine, tumorigénèse, invasion cellulaire, prolifération cellulaire

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	I
LISTE DES FIGURES	IV
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VIII
1. INTRODUCTION	1
1.1 LE TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA	1
1.1.1 SUPERFAMILLE DU TGF β	2
1.1.2. STRUCTURE	4
1.1.3 PROCESSUS DE MATURATION ET D'ACTIVATION DU TGF β	6
1.1.3.1 Les convertases de proprotéines	10
1.1.3.1.1 La furine	14
1.1.3.2 La thrombospondine-1	20
1.1.3.3 Les intégrines de la famille α_v	21
1.1.3.4 La plasmine	24
1.1.3.5 Les métalloprotéases	25
1.1.4 LES VOIES DE SIGNALISATION DU TGF β	30
1.1.4.1 La voie des Smads	33
1.1.4.2 Les autres voies de signalisation	36
1.1.5 LES RÔLES DU TGF β	41
1.2 LE CANCER	46
1.2.1 DÉFINITION DU CANCER	46
1.2.2 LES CAUSES DU CANCER	47
1.2.3 LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DU CANCER	49
1.3 LE CANCER ET LA FURINE	56
1.4 LE TGF β ET LE CANCER	59
1.5 OBJECTIF ET PERTINENCE DU PROJET DE RECHERCHE	65
2. MATÉRIEL ET MÉTHODE	68
2.1 CULTURE DE CELLULES	68
2.2 TRANSFECTIONS STABLES	68
2.3 CONSTRUCTION DES VECTEURS D'EXPRESSION	69
2.4 IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN	72

2.4.1 PRÉPARATION DES CELLULES	72
2.4.2 PRÉPARATION DES SURNAGEANTS	73
2.4.3 PRÉPARATION DES LYSATS PROTÉIQUES	74
2.4.4 DOSAGE DES PROTÉINES	74
2.4.5 BUVARDAGE DE TYPE WESTERN	74
2.5 PCR QUANTITATIF EN TEMPS RÉEL	77
2.5.1 EXTRACTION DE L'ARN MESSAGER	77
2.5.2 TRANSCRIPTION INVERSE	77
2.5.3 CLONAGE DES GÈNES	78
2.5.4 RÉACTION DE PCR QUANTITATIF EN TEMPS RÉEL	79
2.6 IMMUNOFLUORESCENCE	80
2.7 INCORPORATION DE THYMIDINE	82
2.8 ESSAI D'INVASION SUR UNE MATRICE DE COLLAGÈNE	82
2.8.1 PRÉPARATION DES FILTRES	83
2.8.2 L'ESSAI D'INVASION	83
2.9 ZYMOGRAPHIE	85
2.10 FORMATION D'INVADOPODES	85
2.10.1 PRÉPARATION DES LAMELLES	85
2.10.2 L'ESSAI DE FORMATION D'INVADOPODES	86
2.11 ESSAI DE MOTILITÉ CELLULAIRE PAR RÉTRÉCISSEMENT DES PLAIES	87
2.11.1 CONTRASTE DE PHASE	87
2.11.2 MARQUAGE DE L'ACTINE EN IMMUNOFLUORESCENCE	88
2.12 ESSAI D'ADHÉSION CELLULAIRE	88
2.13 ESSAI DE MORPHOLOGIE CELLULAIRE	89
2.14 DOSAGE DU TGFβ BIOACTIF PAR ELISA	90
2.15 MODÈLE DE PROGRESSION TUMORALE	91
2.15.1 PRÉPARATION DES CELLULES	91
2.15.2 INJECTION DES SOURIS	91
2.15.3 INCIDENCE ET CROISSANCE TUMORALE	91
2.15.4 EXTRACTION DES PROTÉINES ET DE L'ARN MESSAGER DES TUMEURS	92
2.16 ANALYSE STATISTIQUE	93
 3. RÉSULTATS	 94
 3.1 CARACTÉRISATION DU MODÈLE CELLULAIRE UTILISÉ	 94
3.1.1 CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE DES CELLULES HT1080	94
3.1.2 RÉPONSE AU TGFβ DES CELLULES HT1080	98
3.2 CARACTÉRISATION DES TRANSFECTANTS STABLES	106
3.2.1 EXPRESSION ET FONCTIONNALITÉ DES TRANSGÈNES	107
3.2.2 INDUCTION DE GÈNES CIBLES DU TGFβ	111
3.3 IMPACT DE LA MATURATION DU TGFβ PAR LA FURINE DANS LA TUMORIGÈNESE	114
3.3.1 LA PROLIFÉRATION	114
3.3.1.1 Modèle cellulaire <i>in vitro</i>	114
3.3.1.2 Modèle de progression tumorale <i>in vivo</i>	116
3.3.1.2.1 La croissance tumorale	116
3.3.1.2.2 Expression des transgènes et activation de la voie des Smads chez les tumeurs	119
3.3.2 LA DÉDIFFÉRENCIATION	121
3.3.3 L'INVASION CELLULAIRE	124

3.3.3.1 L'adhésion	127
3.3.3.2 La production de MMP-2	128
3.3.3.3 La formation d'invadopodes	130
3.3.3.4 La motilité cellulaire	133
3.4 IMPACT DE LA MATURATION DU TGFβ PAR LA FURINE SUR LE TYPE DE MIGRATION DES CELLULES	136
3.4.1 LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE	137
3.4.2 LES TYPES DE MIGRATION	138
<u>4. DISCUSSION</u>	142
<u>5. CONCLUSION</u>	175
<u>6. REMERCIEMENTS</u>	178
<u>7. RÉFÉRENCES</u>	180

Liste des figures

Figure 1 : Séquence du TGFβ	5
Figure 2 : Maturation et activation du TGFβ	8
Figure 3 : Les convertases de proprotéines	11
Figure 4 : Processus d'activation de la furine	19
Figure 5 : Organisation des sous-unités des intégrines	22
Figure 6 : Structure des métalloprotéases	26
Figure 7 : La voie des Smads	37
Figure 8 : Interactions entre les voies du TGFβ et les voies Wnt, Shh, Delta/Jagged, INF-γ, Stat3 et Ras	39
Figure 9 : Implication du TGFβ dans l'hématopoïèse	43
Figure 10 : Progression tumorale	53
Figure 11 : Implication des molécules d'adhésion dans la progression tumorale	54
Figure 12 : Rôles du TGFβ dans la tumorigénèse	61
Figure 13 : Caractérisation phénotypique du modèle cellulaire utilisé	95
Figure 14 : Impact du TGFβ sur la prolifération des cellules HT1080	99
Figure 15 : Impact du TGFβ sur la capacité d'adhésion des cellules HT1080 à une matrice de collagène	101

Figure 16 : Impact du TGFβ sur la capacité d'invasion des cellules HT1080	102
Figure 17 : Impact du TGFβ sur la production de MMP-2 active	104
Figure 18 : Impact du TGFβ sur la motilité des cellules HT1080	105
Figure 19 : Expression des transgènes chez les transfectants stables	109
Figure 20 : Sécrétion de TGFβ bioactif par les transfectants stables	110
Figure 21 : Expression de la forme phosphorylée de Smad2	112
Figure 22 : Localisation des principaux R-Smad chez les transfectants stables	113
Figure 23 : Induction de gènes cibles du TGFβ	115
Figure 24 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine sur la prolifération des cellules	117
Figure 25 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine sur la progression tumorale	118
Figure 26 : Expression du TGFβ et fonctionnalité de la voie des Smads dans les tumeurs	120
Figure 27 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine sur la différenciation des cellules	123
Figure 28 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine sur la capacité d'invasion des cellules	125
Figure 29 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine sur la capacité d'adhésion des cellules	126

Figure 30 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine sur la production de	
MMP-2 _____	129
Figure 31 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine sur la formation	
d'invadopodes _____	131
Figure 32 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine sur la motilité cellulaire	134
Figure 33 : Caractéristiques phénotypiques des cellules motiles _____	135
Figure 34 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine sur la morphologie des	
cellules _____	140
Figure 35 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine le type de migration des	
cellules _____	141

Liste des tableaux

Tableau I : Distribution et phénotype nul des convertases de proprotéines _____	12
Tableau II : Exemples de substrats de la furine _____	15
Tableau III : Liste des ligands des intégrines de la famille α_v _____	23
Tableau IV : Substrats et effets biologiques des métalloprotéases _____	27
Tableau V : Transfectants stables représentés par le nom du plasmide correspondant _____	69
Tableau VI : Anticorps primaires et leur anticorps secondaire correspondant _____	76
Tableau VII : Oligonucléotides utilisés pour le PCR quantitatif en temps réel _____	79
Tableau VIII : Anticorps utilisés pour l'immunofluorescence _____	80
Tableau IX : Caractéristiques phénotypiques des cellules HT1080 _____	97

Liste des abréviations

α_2 MR	α_2 -macroglobulin receptor
ADAM	A disintegrin and metalloprotease
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	Acide déoxyribonucléique complémentaire
ALK	Activin like kinase
Ap-1	Activator-protein 1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARTS	Apoptosis-related proteins in the transforming growth factor signaling pathway
Asp	Asparagines
ATF-2	Activating transcription factor 2
BAMBI	Bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BM-40	Basement membrane protein 40
BMP	Bone morphogenetic protein
BNP	B-type natriuretic peptide
BSA	Albumine de serum bovin
CaCl ₂	Dichlorure de calcium
CaPO ₄	Tétraoxyde de phosphate de calcium

CBP/p300	CREB binding protein
CMV	Cytomegalovirus
CO ₂	Dioxyde de carbone
ConA	Concanavaline A
Co-Smad	Common-partner Smad
COX-2	Cyclooxygenase 2
CTGF	Connective tissue growth factor
Cyr61/IGFBP-10	Insuline-like growth factor binding protein 10
Cys	Cystéine
Dab2	Disabled 2
Dapi	4',6-diamino-2-phenylindole, dilactate
Dapk	Death associated protein kinase
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EBV	Epstein Barr virus
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
Egr-1	Early growth response 1
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	Epithelial to mésenchymal transition
ERK	Extracellular-regulated kinase
Ets-1	V-ets erythroblastosis avian virus E26 oncogene homolog 1

FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Sérum de veau foetal
FKBP12	FK506 (tacrolimus) binding protein 12
FLT3	Foetal liver tyrosine kinase 3
Foxp3	Forkhead box protein 3
FucT VIII	GDP-L-Fuc:N-acetyl- β -D-glucosaminide- α 1,6-fucosyltransferase VIII
FYVE	Fab1p, Yotb, Vac1p and EEA1
G-418	Généticin 418
GDF	Growth differentiation factor
GM-CFU	Progéniteur commun des granulocytes et des monocytes
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 β
HCl	Chlorure d'hydrogène
HIF-1	Hypoxia inducible factor 1
His	Histidine
HPP-E-BFU	Progéniteur des érythrocytes à haut potentiel prolifératif
HPP-Emk	Progéniteur commun des érythroblastes et des mégacaryocytes à haut potentiel prolifératif
HPP-Mk-BFU	Progéniteur des mégacaryocytes à haut potentiel prolifératif
IgCAM	Immunoglobulin superfamily of cellular adhesion molecule
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGFBP-3	Insuline-like growth factor binding protein 3

IgG	Immunoglobuline G
Il-1	Interleukine 1
Il-6	Interleukine 6
Il-10	Interleukine 10
Il-12	Interleukine 12
Il-13	Interleukine 13
Il-2R	Récepteur de l'interleukine 2
ILK	Integrin-linked kinase
INF- γ	Interféron γ
I-Smad	Inhibitory Smad
JNK	c-Jun NH-terminal kinase
LAP	Latent associated protein
LEF-1	Lymphoid enhancer-binding factor 1
Limk-2	Lim motif containing protein kinase 2
LMO4	Lim-only factor 4
LMO7	Lim-only factor 7
LMO7S	Lim-only factor 7 splicing variant
LPA	Lysophatidic acid
LPC	Lymphoma proprotein convertase
LRP-1	Low-density-lipoprotein receptor-related protein 1
LTBP-1	Latent transforming growth factor binding protein 1
MAPK	Mitogen activated protein kinase

MCP-3	Monocyte chemotactic protein 3
MEC	Matrice extracellulaire
MEM	Minimum essential medium
MET	Mesenchymal to epithelial transition
MgCl ₂	Dichlorure de magnesium
MH	Mad homology
MIS	Müllerian inhibiting substance
MMP	Matrix metalloproteinase
MT1-MMP	Membrane-type 1 matrix metalloproteinase
NaCl	Chlorure de sodium
NAPDH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NFκB	Nuclear factor kappa B
NGF-β	Nerve growth factor β
NHE1	Na(+)/H(+) exchanger 1
NK	Natural killer
NO	Nitric oxide
NOS2	Nitric oxide synthase 2
NP-40	Nonidet P40
NPP2	Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2
NRK	Normal rat kidney
PACE	Paired basic amino-acid-cleaving enzyme
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1

PBS	Phosphate buffered saline
PC	Proprotein convertase / convertase de proprotéines
PCR	Polymerase chain reaction
PCSK9/NARC-1	Neural apoptosis-regulated convertase 1
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDX	α_1 -antitrypsin Portland
PGE ₂	Prostaglandine E2
PI3K	Phosphatidyl inositol 3-phosphates kinase
PIP ₃	Phosphatidyl inositol 3-phosphates
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PVDF	Polyvinylidene difluoride
PVPF	Polyvinylpyrrolidone free
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Ras	Rous avian sarcoma
RE	Réticulum endoplasmique
RGD	Arginine/glycine/aspartate
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RhoGDI	RhoGDI dissociation inhibitor
	GDI : Guanosine 5'-diphosphate dissociation inhibitor
ROCK	Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase

ROS	Reactive oxygen species
RPL-P0	Ribosomal protein LP0
R-Smad	Receptor-regulated Smad
RTK	Récepteurs tyrosines kinases
SARA	Smad anchor for receptor activation
SDS	Sodium lauryl sulphate
Sema3	Sémaphorine de classe 3
SGF	Sarcoma growth factor
Shh	Sonic hedgehog
Ship	SH2 domain-containing inositol phosphatase
Ski	Sloan kettering virus family oncoprotein
SKI-1/S1P	Subtilisin/kexin-like isozyme-1
SKIP	Ski-interacting protein
Smad	Contraction de Sma et Mad Sma : Small and dumpy mutants for <i>C. elegans</i> male tail abnormalities Mad: Mothers against decapentaplegic
SMA- α	Smooth muscle actin α
SMIF	Sperm motility initiation factor
Smurf	Smad ubiquitin regulatory factor
SnoN	Ski-related novel protein N
Stat6	Signal transducers and activators of transcription 6

SV40	Simian virus 40
Swift	Smad wing for transcriptional activation
TAK	Transforming growth factor activated kinase 1
TCF-4	T-cell factor 4
TFE3	Transcription factor E3
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TGF α	Transforming growth factor α
TGF β	Transforming growth factor β / facteur de transformation de type β
TIEG	Transforming growth factor β inducible early gene 1
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF- α	Tumor necrosis factor α
tPA	Tissue-type plasminogen activator
TRAP	Thrombospondin related adhesive protein
TRITC	Tetramethyl rhodamine iso-thiocyanate
TrkB	Tropomyosin-related kinases B
TSP	Thrombospondine
T β R	Transforming growth factor β receptor
uPA	Urokinase-like plasminogène activator
uPAR	Urokinase-like plasminogène activator receptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
v-fes/fps	Feline sarcoma virus transforming gene / avian fujinami sarcoma

	virus transforming gene
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
V-Src	Viral sarcoma
Wnt	Contraction de wingless et int
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
Zeb-1	Zinc finger E-box binding transcription factor 1
Zn ²⁺	Zinc

1. Introduction

1.1 Le Transforming Growth Factor beta

Dans les années 1970, le Dr Holley a émis l'hypothèse que les cellules transformées requièrent moins de facteurs de croissance et d'hormones que les cellules normales (Holley, 1975). Cette hypothèse a conduit à l'élaboration de la théorie de la sécrétion autocrine selon laquelle les cellules transformées peuvent s'autostimuler en sécrétant leurs propres facteurs de croissance et en y répondant par la présence de récepteurs spécifiques à leur surface (Sporn et Todaro, 1980).

Dans ces mêmes années, une équipe de recherche a démontré que des cellules transformées par le *Sarcoma Virus* développaient la capacité de former des colonies dans de l'agar mou grâce à la sécrétion d'un facteur inconnu qu'ils ont appelé SGF (*Sarcoma Growth Factor*) (De Larco et Todaro, 1978 ; Todaro et De Larco, 1978). L'équipe du Dr Sporn a tenté d'isoler et de caractériser ce nouveau facteur. Pour ce faire, son équipe a fait des extractions acide-éthanol et a ainsi obtenu différentes fractions (Sporn, 2005). Lorsque la fraction purifiée de SGF était soumise à une filtration sur gel, elle perdait sa capacité d'induire la formation de colonies de cellules fibroblastiques NRK (*Normal Rat Kidney*) dans de l'agar mou. Par contre, deux de ces fractions inactives, une fois mélangées ensemble, pouvaient induire les effets du SGF à

nouveau (Roberts et al, 1981 ; Anzano et al, 1982a). Ceci a mené l'équipe du Dr Sporn à penser que le SGF serait en fait une combinaison de deux facteurs de croissance.

En examinant le contenu de la première fraction, ils ont découvert un facteur de croissance capable d'induire la formation de petites colonies de cellules NRK dans de l'agar mou et compétitionnant fortement pour le récepteur du facteur EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Anzano et al, 1982b). Ils ont nommé ce facteur TGF α (*Transforming Growth Factor α*). Dans la seconde fraction, ils ont isolé un facteur ne compétitionnant pas avec l'EGF, mais capable d'induire la formation de larges colonies de cellules NRK dans de l'agar mou en présence de faibles quantités de EGF (Anzano et al, 1982a). C'était la découverte du TGF β (*Transforming Growth Factor β*) (Frolik et al, 1983).

1.1.1 Superfamille du TGF β

Les membres de la superfamille du TGF β sont impliqués dans le développement et la reproduction. On peut les diviser en quatre catégories soit les ligands, les récepteurs, les protéines de signalisation Smads (contraction de *Sma* et *Mad*) et les autres membres.

On compte 35 ligands différents chez les vertébrés. On peut les diviser en huit sous-classes : TGF β , BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*), GDF (*Growth Differentiation Factors*), les activines, les inhibines, MIS (*Müllerian Inhibiting Substance*), *Nodal* et *Lefty* (Chang et al, 2002).

Tous ces ligands signalent par des récepteurs de type sérine/thréonine kinase. On retrouve les récepteurs de type I et les récepteurs de type II. Les récepteurs de type II possèdent une activité kinase constitutivement active (de Caestecker, 2004). Pour induire un signal, deux récepteurs de type II couplés à leur ligand doivent s'associer avec deux récepteurs de type I et les activer (Moustakas et al, 1995).

Le signal est transmis par les protéines Smads. Ces protéines doivent leur nom à la présence d'un domaine conservé chez l'ensemble des Smads, soit le motif MH (*Mad Homology*) (Massagué, 2000 ; Itoh et al, 2000 ; Chang et al, 2002). On compte huit protéines Smads divisées en trois classes : les Co-Smads (*Common-partner Smad*), les I-Smads (*Inhibitory Smad*) et les R-Smads (*Receptor-Regulated Smad*). Les Co-Smads sont constitués de Smad4 et xSmad4 β , les I-Smads sont représentés par Smad6 et Smad7 et les R-Smads regroupent Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 et Smad8 (Itoh et al, 2000 ; Goumans et Mummery, 2000). Les Co-Smads et les R-Smads possèdent 2 domaines MH, MH1 et MH2, alors que les I-Smads n'ont que le MH2 (Itoh et al, 2000).

Enfin, plusieurs autres molécules impliquées dans la signalisation des membres de la superfamille du TGF β constituent la dernière catégorie de cette famille. Voici quelques exemples de ces protéines : la thrombospondine-1, impliquée dans l'activation du TGF β (Yevdokimova et al, 2001), la follistatine, *Noggin* et la chondrine toutes trois des antagonistes des ligands de la superfamille du TGF β (Chang et al, 2002).

1.1.2. Structure

Le TGF β est sécrété sous la forme d'une proprotéine homodimérique de 55 kDa. Il est donc constitué de deux chaînes polypeptidiques reliées par des ponts disulfures qui font intervenir les cystéines 223 et 225 du propeptide (Frolik et al, 1983 ; Gleizes et al, 1997). À la suite de sa sécrétion, le TGF β est N-glycosylé sur trois asparagines, soit Asp82, Asp136 et Asp176, situées en N-terminal (Brunner et al, 1988). Sur deux de ces sites de glycosylation, on retrouve des mannoses-6-P impliqués dans le processus d'activation du TGF β (Gleizes et al, 1997).

Chez les plaquettes, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les glioblastomes, les ostéosarcomes et les cellules d'origine épithéliale ou endothéliale, on retrouve le TGF β latent associé à la protéine LTBP-1 (*Latent TGF β Binding Protein-1*) par des liens disulfures entre la cystéine 33 du TGF β latent et la troisième cystéine de la répétition 8-Cys du LTPB-1 (Saharinen et al, 1996). Cette interaction entre le TGF β et le LTBP-1 a été observée pour la première fois en 1988 chez les plaquettes (Miyazono et al, 1988).

Le LTBP-1 est une glycoprotéine de 130 kDa à 190 kDa qui se lie de façon covalente à la matrice extracellulaire par la transglutaminase (Gleizes et al, 1997). Cette interaction permet l'association du TGF β à la matrice extracellulaire pendant le processus d'activation (Saharinen et al, 1996 ; Gleizes et al, 1997).

<p> MPPSGLRLLPLLLPLLWLLVLT GRPAAGLSTCKTIDMELVKRKRIE AIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPE PEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEI YDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAV PEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHV ELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSD SPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIE GFRLSAHCSDSRDNTLQVDINGF TTGRRGDLATIHGMNRPFLLMA TPLERAQHLQSSRHRRALDTNYC FSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWK WIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLD TQYSKVLALYNQHNP GASAAPCC VPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLS NMIVRSCKCS </p> <p>(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=63025221)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Peptide signal (Gentry et al, 1988) • Site de liaison au LTBP (Saharinen et al, 1996) • Site de liaison à TSP-1 (Schultz-Cherry et al, 1994b) • Site de liaison à TRAP (Omer et al, 2003) • Site de clivage par la plasmine (Gleizes et al, 1997) • Site de clivage par la MMP-13 (Deng, 2000) • Sites de dimérisation du LAP (Brunner et al, 1989) • Site de liaison aux intégrines de la famille α_v (Sheppard, 2005) • Site de maturation par la furine (Dubois et al, 1995)
---	---

Figure 1 : Séquence du TGF β . Le TGF β interagit avec plusieurs molécules telles la furine, la thrombospondine-1, les métalloprotéases, les intégrines de la famille α_v et la plasmine. Plus précisément, il est maturé par la furine et activé grâce à l'action combinée de la thrombospondine-1, de la plasmine, des métalloprotéases et des intégrines de la famille α_v .

Si on regarde la séquence du TGF β plus en détail, on constate qu'elle possède des sites de reconnaissance pour plusieurs molécules dont la furine, les métalloprotéases, la thrombospondine-1, la plasmine et les intégrines de la famille α_v (Figure 1). Toutes ces molécules sont impliquées dans le processus de maturation et d'activation du TGF β .

1.1.3 Processus de maturation et d'activation du TGF β

Avant d'exercer ses fonctions biologiques, le TGF β doit être maturé, puis activé. La première étape de cette cascade d'activation est la maturation par la furine. Comme toutes les protéines, le TGF β est synthétisé dans le réticulum endoplasmique avant de se retrouver dans le réseau trans-golgien pour être sécrété. C'est dans l'appareil de Golgi, avant même d'être sécrété, que le TGF β est clivé par la furine au site de reconnaissance $^{275}\text{R-H-R-R}^{278}$ (Dubois et al, 1995 ; Dubois et al, 2001). À la suite de sa maturation, le TGF β se présente sous une forme latente puisqu'il reste associé de façon non covalente à son propeptide LAP (Gleizes et al, 1997). Cette forme latente du TGF β doit s'associer au LTBP-1 pour être sécrétée et ensuite activée (Saharinen et al, 1996). Une fois sécrété, le complexe est recruté à la matrice extracellulaire par une interaction entre le LTBP-1 et la transglutaminase (Gleizes et al, 1997). Une fois lié à la matrice extracellulaire, le LTBP-1 sera en partie clivé par des protéases de type sérine (Gleizes et al, 1997) et le propeptide LAP interagira avec la thrombospondine-1 (TSP-1) (Schultz-Cherry et al, 1994b ; Yevdokimova et al, 2001). L'interaction entre la TSP-1 et le LAP rend le site de clivage de la plasmine accessible pour les étapes subséquentes de

l'activation du TGF β . Plus précisément, la séquence GGWSHW de la TSP-1 permet son association sur la portion mature du TGF β . Cette liaison confère une configuration à la TSP-1 favorisant une interaction entre sa séquence KRFK et la portion latente du TGF β . Enfin, l'interaction entre la séquence KRFK et le LAP induit un changement conformationnel de la protéine qui rend possible la suite de l'activation du TGF β (Schultz-Cherry et al, 1995a ; Yee et al, 2004). Il est à noter que la métalloprotéase TRAP, produite par le parasite de la malaria, peut jouer le même rôle que la thrombospondine-1 dans l'activation du TGF β latent (Omer et al, 2003). Les intégrines de la famille α_v présentes dans la matrice extracellulaire, et plus particulièrement $\alpha_v\beta_5$ (Asano et al, 2005), $\alpha_v\beta_6$ (Fontana et al, 2005) et $\alpha_v\beta_8$ (Cambier et al, 2005), vont également interagir avec LAP pour déstabiliser le complexe LTBP-1 : TGF β (Sheppard, 2005). Le mécanisme exact par lequel les intégrines interviennent dans l'activation du TGF β n'est pas encore connu. En effet, la liaison de la sous-unité β de l'intégrine sur le LAP n'est pas suffisante pour mener à l'activation du TGF β . La queue cytoplasmique de la sous-unité β de l'intégrine doit interagir avec le cytosquelette d'actine de la cellule ou des protéines cytoplasmiques pouvant modifier l'organisation de l'actine pour déstabiliser le LAP et ainsi libérer le TGF β mature (Sheppard, 2001 ; Sheppard, 2005). Le TGF β en partie activé se détache ensuite de la matrice extracellulaire, peut-être avec l'aide des métalloprotéases, dont la MMP-2, la MMP-9 (Yu et Stamenkovic, 2000) et la MMP-13 (Deng, 2000), et retourne à la membrane cytoplasmique où il sera reconnu par les récepteurs du mannose-6-phosphate. Il pourra enfin être clivé par la plasmine et être libéré sous sa forme bioactive (Gleizes et al, 1997). Les différentes étapes de la maturation et de l'activation du TGF β sont résumées à la figure 2.

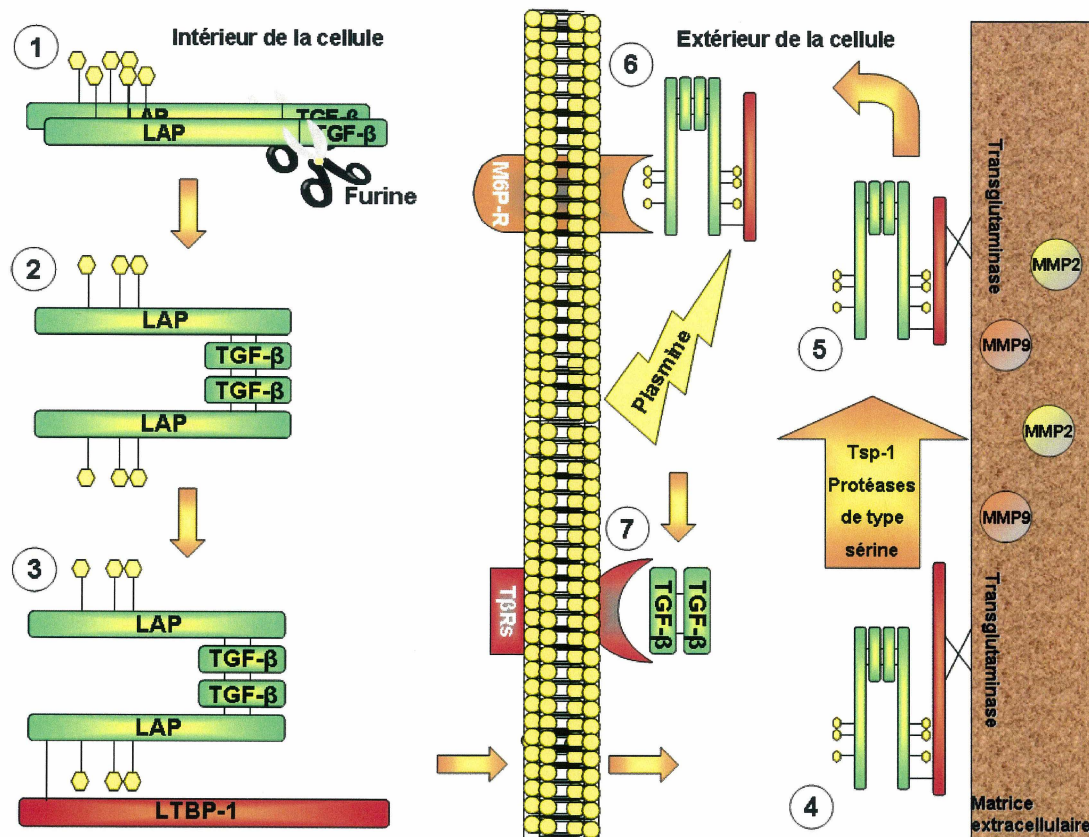


Figure 2 : Maturation et activation du TGFβ. Le TGFβ est d'abord maturé par la furine (1 et 2) pour ensuite s'associer au LTBP-1 et être sécrété (3). Puis, il passe par une cascade d'activation pendant laquelle il interagit avec la TSP-1, les intégrines de la famille α_v et les protéases de type sérine (4). Il se dissocie ensuite de la matrice extracellulaire (MEC) par l'intervention des métalloprotéases (5). Il est recruté à la surface des cellules par les récepteurs du mannose-6-P et son activation est achevée par la plasmine (6). Le TGFβ bioactif peut ensuite s'associer à ses récepteurs (7).

Il est à noter que l'activation du TGF β latent peut être amplifiée par l'Il-13 dans certains cas pathologiques tels que la fibrose tissulaire. En effet, l'Il-13 peut stimuler l'activation du TGF β par les protéases de type sérine, la plasmine et la MMP-9 (Lee et al, 2001). Le mécanisme exact impliqué dans l'induction de ces facteurs d'activation par l'Il-13 n'est pas connu. Toutefois, on sait que ce processus d'activation du TGF β est en partie dépendant de Egr-1 (*Early Growth Response-1*) dont l'expression est induite par l'activation de la voie de Stat6 par l'Il-13 (Cho et al, 2006). Ce phénomène est observé dans certains processus inflammatoires de type T_H2 tels la fibrose pulmonaire (Cho et al, 2006).

Le TGF β actif peut également amplifier son cycle de maturation. En fait, le TGF β peut induire la transcription du gène de la furine par la voie des Smads (Blanchette et al, 1997 ; Blanchette et al, 2001b). Cette amplification de l'expression de la furine implique également la voie de p42/p44 qui peut stimuler la translocation de Smad2 au noyau (Blanchette et al, 2001a).

Dans des conditions pro-inflammatoires et dans l'environnement des cellules tumorales, il y a production d'oxyde nitrique (NO) par l'intermédiaire de la NOS2 (*Nitric Oxide Synthase 2*) produite par les macrophages et d'autres espèces oxygénées réactives (ROS) par l'action de la NADPH oxydase des macrophages (Barcellos-Hoff et Dix, 1996). Entre autres, la catalyse du fer en présence d'acide ascorbique peut mener à la production de plusieurs ROS dont le radical hydroxyl, le superoxide et le peroxide d'hydrogène. Le NO et les ROS ainsi produits peuvent activer le TGF β latent dans ces

conditions pathologiques (Barcellos-Hoff et Dix, 1996 ; Vodovotz et al, 1999). En fait, les ROS oxydent certains acides aminés du LAP et induisent ainsi la formation de chaînes latérales de carbonyl dans la protéine. Les ROS peuvent oxyder les lysines, les arginines, les prolines et les thréonines qui constituent 27% du LAP. Toutes ces oxydations empêchent l'interaction entre le LAP et le TGF β et permettent ainsi le relâchement du TGF β bioactif (Pociask et al, 2004).

1.1.3.1 Les convertases de proprotéines

Les convertases de proprotéines forment une famille d'enzymes découvertes entre 1989 et 1996 (Seidah et Chrétien, 1997) et impliquées dans la maturation ou l'activation de proprotéines. On compte 8 membres dans cette famille soit la furine, la PC2, la PC1/3, la PACE4, la PC4, la PC5/6A, la PC5/6B et la PC7 (Steiner, 1998). Elles clivent les peptides à la suite de leur séquence de reconnaissance R-X-K/R-R où X représente un acide aminé basique quelconque. Elles peuvent également reconnaître des séquences minimales telles que R-R et K-R (Fugère et Day, 2005). Toutes les convertases de proprotéines ont une séquence conservée d'une grande homologie avec la kexine, une protéase de la levure découverte en 1984 (Seidah et Chrétien, 1997). Cette protéase a elle-même une forte homologie avec la protéase de type sérine subtilisine bactérienne (Steiner, 1998). Les structures des convertases de proprotéines et de leurs homologues, la kexine et la subtilisine bactérienne, sont présentées à la figure 3.

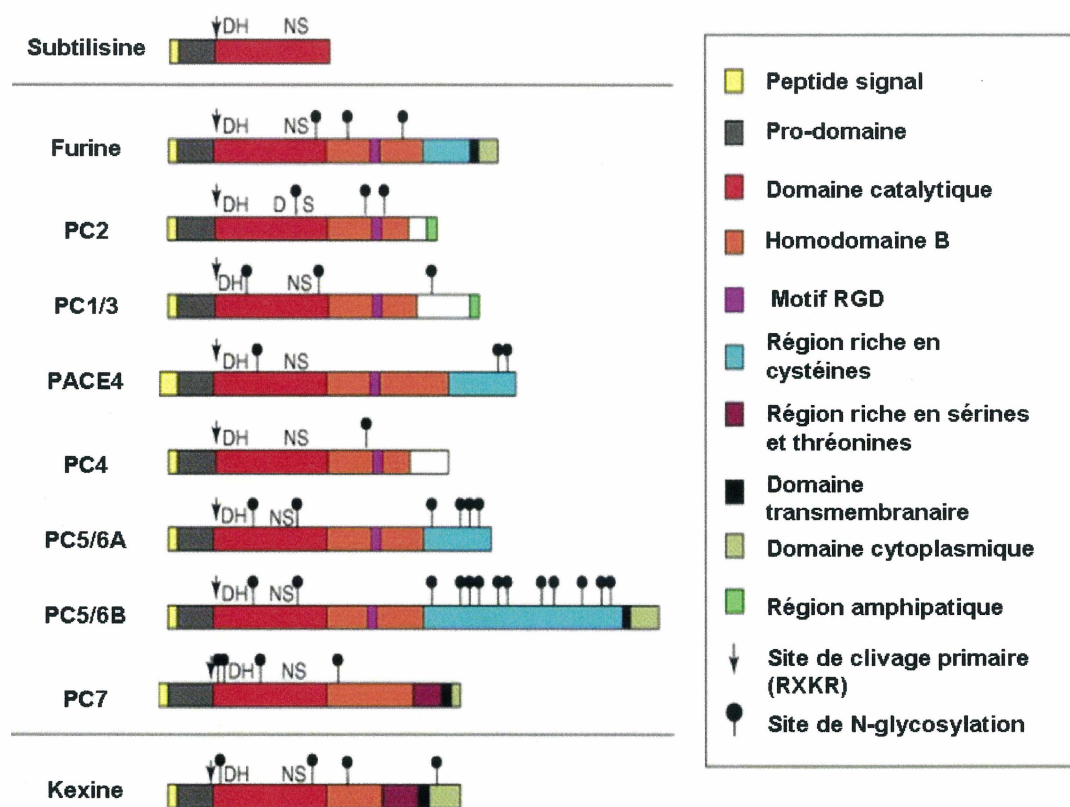


Figure 3 : Les convertases de proprotéines.

Adaptée de Fugère, M. et R. Day, 2005

Tableau I : Distribution et phénotype nul des convertases de proprotéines

PCs	Distribution tissulaire	Compartiments cellulaires	Phénotype nul
Furine	Ubiquiste	Trans-Golgi, endosomes et surface cellulaire	<ul style="list-style-type: none"> • Mortalité au jour E10,5-11,5 • Défaut de la fermeture ventrale • Absence de rotation axiale • Vasculature anormale du sac vitellin • Absence de fusion chorioallantoïque
PC1/3 (modèle de souris)	Neuroendocrine	Granules denses de sécrétion	<ul style="list-style-type: none"> • Mortalité prénatale et post-natale • Nanisme • Diarrhée chronique mineure
PC1/3 (modèle de souris)	Neuroendocrine	Granules denses de sécrétion	<ul style="list-style-type: none"> • Mortalité embryonnaire
PC1/3 (patient)	Neuroendocrine	Granules denses de sécrétion	<ul style="list-style-type: none"> • Obésité • Homéostasie glucidique déficiente • Défauts dans les fonctions gastro-intestinales • Hypogonadisme hypogonadotrope • Hypocortisolisme
PC2	Neuroendocrine	Granules denses de sécrétion	<ul style="list-style-type: none"> • Retard dans la croissance post-partum • Hypoglycémie • Défauts dans la maturation des peptides endocriniens
PC4	Cellules germinales	Non déterminé	<ul style="list-style-type: none"> • Fertilité réduite
PACE4	Ubiquiste	Trans-Golgi, surface cellulaire	<ul style="list-style-type: none"> • Quelques mortalités embryonnaires au jour E13,5-15,5 • Malformations cardiaques • Défauts dans la rotation axiale • Malformations craniofaciales
PC5/6A	Ubiquiste	Trans-Golgi, granules denses de sécrétion	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de modèle disponible

PC5/6B	Ubiquiste	Trans-Golgi, endosomes, surface cellulaire	• Mort embryonnaire au jour E10,5-11,5
LPC	Ubiquiste	Trans-Golgi, endosomes, surface cellulaire	• Pas de phénotype particulier répertorié

Adapté de Taylor, N. A. et al, 2003

Les convertases de proprotéines ont presque toutes une distribution ubiquiste dans l'organisme. Toutefois, la PC1 et la PC2 sont des protéines de type neuroendocrine et la PC4 se retrouve principalement dans les cellules germinales (Taylor et al, 2003). On peut les retrouver dans différents compartiments cellulaires tels que présenté au tableau I.

De par leur rôle dans l'activation de certaines hormones, de neuropeptides, de facteurs de croissance et de différenciation, de protéines de la matrice extracellulaire, d'enzymes et de récepteurs, les convertases de proprotéines sont essentielles au maintien de l'homéostasie au sein de l'organisme (Fugère et Day, 2005). Ainsi, une déficience dans l'une ou l'autre de celles-ci peut entraîner des manifestations pathologiques importantes (Taylor et al, 2003) dont des exemples sont présentés au tableau I.

Les convertases de proprotéines sont aussi impliquées dans divers processus pathologiques comme le cancer (Bassi et al, 2005), les infections bactériennes avec présence de toxines telles que la diphtérie, l'anthrax et les infections gastro-intestinales à

Aeromonas hydrophila, les infections virales telles que le VIH et l'*influenza* et les maladies dégénératives telles que l'Alzheimer et la démence (Taylor et al, 2003).

Dans les dernières années, deux nouvelles convertases de proprotéines ont été découvertes soit SKI-1/S1P de la sous-famille de la pyrolysine et PCSK9/NARC-1 de la sous-famille de la protéinase K. Ces deux convertases ont moins d'homologie avec la kexine de levure et la subtilisine bactérienne que les autres et ne reconnaissent pas les mêmes sites. Leurs sites de reconnaissance sont R-X-X où le premier X représente un acide aminé aliphatique pour SKI-1/S1P et (V/I)-F-A-Q pour PCSK9/NARC-1 (Benjannet et al, 2006).

1.1.3.1.1 La furine

La furine a d'abord été identifiée en 1986 dans la région directement en amont du proto-oncogène v-fes/fps. Son nom lui vient de sa localisation sur le gène *fur* (Roebroek et al, 1986). Il s'agit d'une convertase de proprotéines impliquées dans la maturation de protéines du sérum, d'hormones, de facteurs de croissance, de récepteurs, de chaperonnes, de protéines de la matrice extracellulaire, de toxines bactériennes et de protéines virales tels que présentés au tableau II.

La furine clive ses substrats à la suite de ses sites de reconnaissance. Elle reconnaît en fait un site optimal, soit R-X-K/R-R où X représente un acide aminé basique, et deux

sites minimaux de reconnaissance soient R-X-X-R et L/R-X-X-X-L/R-R où X représente encore un acide aminé basique (Molloy et al, 1992).

Tableau II : Exemples de substrats de la furine

Substrats	Séquences de reconnaissance	Références
Protéines du sérum		
Pro-albumine	RGVFRDA	Misumi et al, 1991 ; Brennan et Nakayama, 1994
Pro-facteur IX	LNRPKRYN	Wasley et al, 1993
Pro-protéine C	RSHLKRDT	Drews et al, 1995
Pro-facteur de von Willebrand	SHRSKRSL	Van de Ven et al, 1990 ; Wise et al, 1990
Hormones et facteurs de croissance		
Précurseur de BMP4	RRRAKRSP	Cui et al, 1998
BMP-1	RSRSRAA	Kessler et al, 1996
Pro-BNP	TLRAPRSP	Sawada et al, 1997
Pro-hormone parathyroïdienne	KSVKKRSV	Hendy et al, 1995
Pro-sémaphorine B	KRRTRRQD	Adams et al, 1997
Pro-TGFβ	SSRHRRAL	Dubois et al, 1995 ; Dubois et al, 2001
Récepteurs à la surface cellulaire		
Pro-récepteur de l'insuline	PSRKRRSL	Mondino et al, 1991 ; Bravo et al, 1994
Récepteur de Notch1	GGRQRREL	Logeat et al, 1998
Pro-récepteur de la vitamine B ₁₂	LQRQKRSI	Kozyraki et al, 1998
Protéines chaperonnes		
Pro-7B2	QRRKRRSV	Paquet et al, 1994
Protéines de la matrice extracellulaire		
MT1-MMP	NVRRKRYA	Sato et al, 1996
Chaîne α ₃ des intégrines	PQRRRRQL	Lehmann et al, 1996
Profibrilline	RGRKRRST	Milewicz et al, 1995
Stromélysine-3	RNRQKRFV	Pei et Weiss, 1995
Toxines bactériennes		

Toxine PA de <i>Bacillus anthracis</i>	NSRKKRST	Klimpel et al, 1992 ; Molloy et al, 1992
Toxine α de <i>Clostridium septicum</i>	KRRGKRSV	Gordon et al, 1997
Toxine DT de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	GNRVRRSV	Tsuneoka et al, 1993
Proaérollysine	KVRRARSV	Abrami et al, 1999
Exotoxine A de <i>Pseudomonas</i>	RHRQPRGW	Moehring et al, 1993
Toxine PE de <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	SNSRKKRST	Ogata et al, 1990
Toxine ST de <i>Shigella dysenteriae</i>	ASRVARMA	Garred et al, 1995
Toxines SLT-II et SLT-IIv de <i>Escherichia coli</i>	QGARSVRVAV	Samuel et Gordon, 1994
Toxine C2 de <i>Clostridium botulinum</i>	Non déterminée	Ohishi, 1987
Protéines virales		
Héماغلوتينine de l'influenza H5N1	RRRKKRGL	Subbarao et al, 1998
Protéine gB du Cytomégalo virus	THRTRRST	Spaete et al, 1998
Protéine GP de l'Ébola du Zaïre	GRRTRREA	Volchkov et al, 1998
Protéine gB du virus Epstein-Barr	LRRRRRDA	Pellett et al, 1988
Protéine gp160 du VIH	VQREKRAV	Hallenberger et al, 1992 ; Decroly et al, 1994
Protéine E2 du virus de la bronchite infectieuse	TRRFRRSI	Cavanagh et al, 1986
Protéine F _o du virus de la rougeole	SRRHKRFA	Richardson et al, 1986
Protéine F du virus syncytial	KKRKRRFL	Collins et al, 1984
Protéine env du virus du sarcome de Rous	GIRRKRSV	Schwartz et al, 1983
Protéine M du virus de la fièvre jaune	SGRSRRSV	Rice et al, 1985

Adapté de Molloy, S.S. et al, 1999

La furine est synthétisée sous la forme d'une glycoprotéine transmembranaire de type I inactive de 96 kDa (Molloy et al, 1994 ; Henrich et al, 2003). Une fois synthétisée dans le réticulum endoplasmique, la forme inactive de la furine est véhiculée par des vésicules transporteuses jusque dans l'appareil de Golgi où elle s'autoclive pour devenir une protéine active de 90 kDa (Leduc et al, 1992). Plus précisément, la furine se replie d'abord sur elle-même. Ce repliement est dirigé par le propeptide qui fait office de chaperonne. Ensuite, il y a une première autoprotéolyse dépendante du calcium. Une fois dans le réseau trans-golgien, la furine subit une deuxième autoprotéolyse dépendante du calcium et de l'acidité qui induit le relâchement du propeptide et l'activation de la furine (Molloy et al, 1999 ; Anderson et al, 2002 ; Thomas, 2002) (Figure 4).

La furine active peut se retrouver dans trois compartiments cellulaires. Elle peut maturer ses substrats dans le réseau trans-golgien, dans les endosomes et à la surface cellulaire (Seidah et Chrétien, 1997 ; Seidah et Chrétien, 1999 ; Molloy et al, 1999 ; Thomas, 2002 ; Taylor et al, 2003 ; Henrich et al, 2003). Elle possède quatre motifs particuliers dans son domaine cytoplasmique qui lui permettent de passer d'un site à l'autre. Le premier motif est une région hydrophobique qui permet son exportation du réseau trans-golgien et son internalisation par la suite. Le second motif est un site de liaison pour la filamine qui permet la localisation de la furine à la membrane plasmique et son recyclage subséquent. Le troisième motif est une région acide qui permet la localisation de la furine dans l'appareil de Golgi. Enfin, le dernier motif est une

séquence signal de localisation basolatérale qui permet à la furine de se rendre à la surface des cellules polarisées (Seidah et Chrétien, 1999 ; Thomas, 2002).

Les rôles de la furine sont aussi variés que le sont ses substrats. Elle est impliquée dans le développement, l'innervation, le développement de certaines pathologies et dans plusieurs infections bactériennes et virales.

Dans le développement, la furine est nécessaire pour la détermination ventrale et la symétrie axiale de l'embryon qui sont régulées par BMP-4 et Notch-1. Elle a également un rôle à jouer dans le développement cardiaque, une autre fonction de BMP-4 (Seidah et al, 1999 ; Thomas, 2002). La furine est aussi impliquée dans le développement de l'épithélium dentaire et des dents puisqu'elle contrôle la signalisation de Eda-1. En effet, c'est la furine qui lui permet de passer à un mode de signalisation paracrine plutôt que juxtacrine lors de la formation des dents (Thomas, 2002). La furine joue également un rôle dans la formation des cuticules en activant la profibrilline requise dans la formation des microfibrilles. D'ailleurs, l'absence de cette activation entraîne le développement d'une forme mineure du syndrome de Marfan (Milewicz et al, 1995 ; Seidah et al, 1999).

La furine est également importante pour l'innervation. Lorsqu'elle clive le pro-NGF- β , la forme active de ce facteur de croissance se lie sur le récepteur Trk et induit ainsi la synapse. En absence d'activation, le pro-NGF- β se lie plutôt sur le récepteur p75^{NTR} et induit l'apoptose de la cellule (Thomas, 2002).

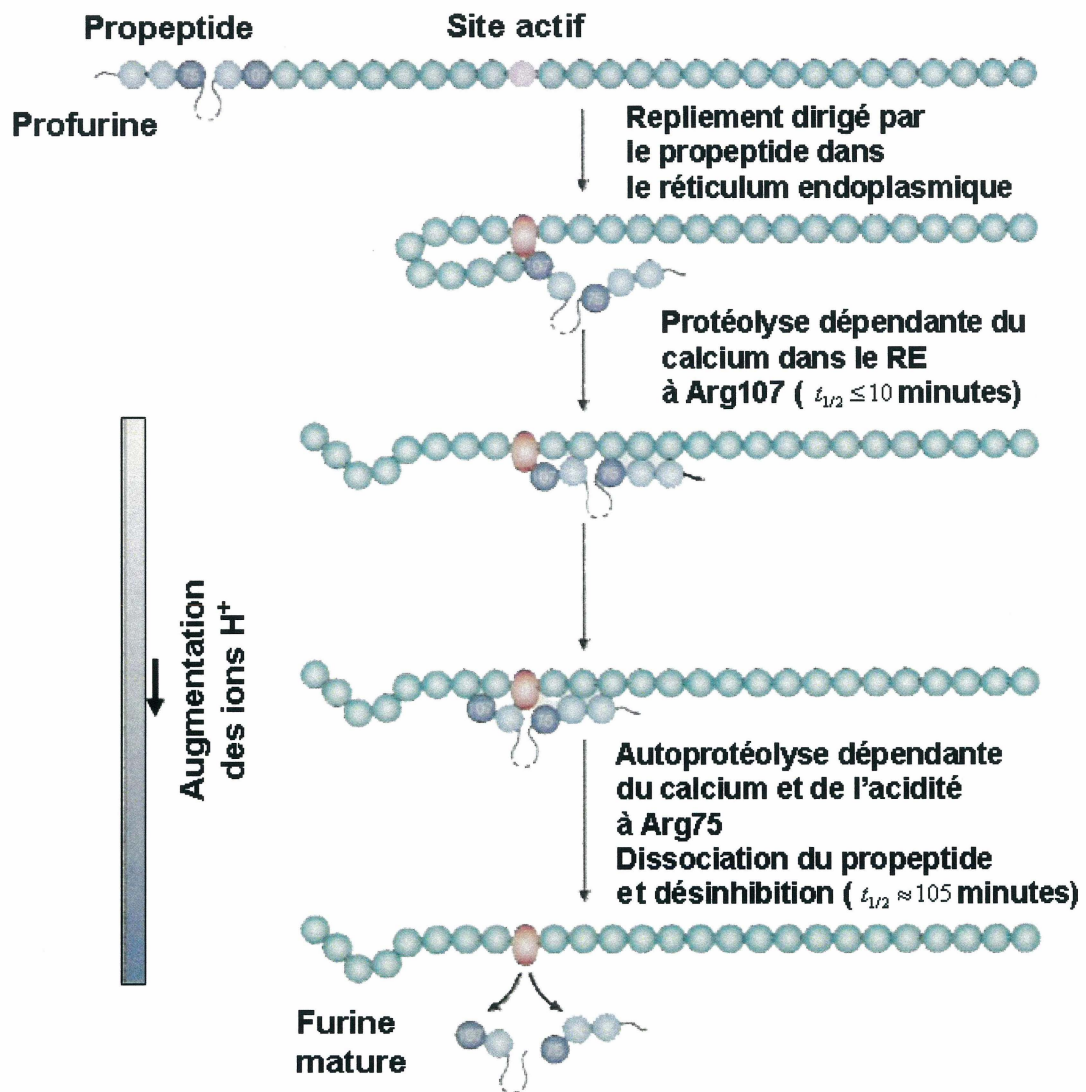


Figure 4 : Processus d'activation de la furine

Adaptée de Thomas, G. 2002

La profurine doit subir deux autoprotéolyses dépendantes du calcium afin d'être activée. La première a lieu dans le réticulum endoplasmique et la seconde dans l'environnement plus acide du réseau trans-golgien. Suite au deuxième clivage, le propeptide est relâché et il ne reste que la furine mature.

La furine est aussi impliquée dans le développement de plusieurs pathologies dont l'athérosclérose. Lors de ce processus, la furine active la MT1-MMP des macrophages présents dans la plaque athéromateuse. Ensuite, la MT1-MMP active la pro-MMP-9 produite par les macrophages et la pro-MMP-2 produite par les cellules musculaires lisses vasculaires. L'action combinée de la MMP-2 et de la MMP-9 rend la plaque athéromateuse plus instable. Une forte activation de ces métalloprotéases est donc synonyme d'un mauvais pronostic (Stawowy et al, 2005).

L'implication de la furine dans les infections bactériennes et virales a déjà été décrite dans la section concernant les convertases de proprotéines. Le rôle de la furine dans la tumorigénèse sera discuté plus loin.

1.1.3.2 La thrombospondine-1

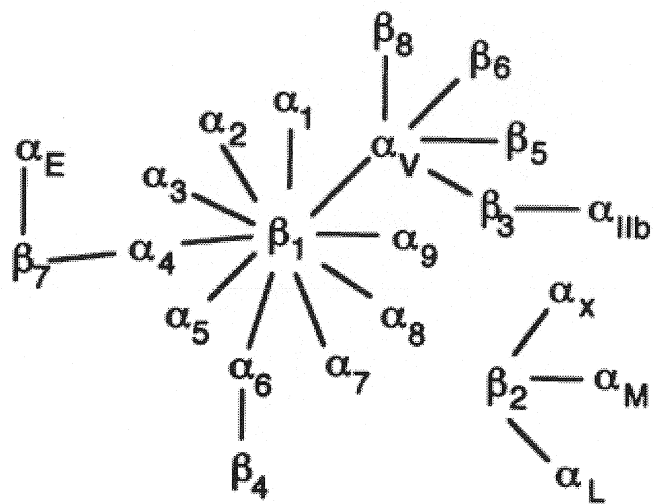
La thrombospondine-1 (TSP-1) a été identifiée pour la première fois en 1971 (Sargiannidou et al, 2001). Elle fait partie de la famille des thrombospondines qui se divisent en deux classes : les trimères qui comprennent la TSP-1 et la TSP-2 et les pentamères qui regroupent la TSP-3, la TSP-4 et la TSP-5 (Bornstein, 2001). La TSP-1 est constituée de trois chaînes polypeptidiques de 145 à 180 kDa reliées par des ponts disulfures (Bornstein, 2001 ; Yevdokimova et al, 2001). Elle forme donc une glycoprotéine de 450 kDa (Sargiannidou et al, 2001). La TSP-1 est particulièrement

abondante dans les granules α des plaquettes, mais on la retrouve également dans d'autres types cellulaires tels que les cellules mésangiales (Bornstein, 2001 ; Yevdokimova et al, 2001). Le niveau de TSP-1 est augmenté chez les cellules en prolifération et chez les cellules cancéreuses. On a retrouvé de forts taux de TSP-1 dans les cellules de carcinomes squameux, de mélanomes, de gliomes, d'ostéosarcomes et d'adénocarcinomes mammaires (Sargiannidou et al, 2001). L'expression de TSP-1 est également augmentée par de fortes concentrations de glucose (Yevdokimova et al, 2001 ; Wahab et al, 2005). On remarque d'ailleurs une forte expression de TGF β activé par la TSP-1 dans les glomérules des patients diabétiques ayant développé des néphropathies (Wahab et al, 2005).

La TSP-1 est impliquée dans plusieurs processus physiologiques dont l'adhésion cellulaire, la motilité, la chimiotaxie et l'angiogénèse (Sargiannidou et al, 2001 ; Borstein, 2001).

1.1.3.3 Les intégrines de la famille α_v

Les intégrines sont formées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . On compte actuellement quinze sous-unités α et huit sous-unités β qui s'apparient tel que présenté à la figure 5 (Luscinskas et Lawler, 1994). Les intégrines de la famille α_v se lie préférentiellement aux sous-unités β_1 , β_3 , β_5 , β_6 , et β_8 (Luscinskas et Lawler, 1995 ; Sheppard, 2005).



Tirée de Luscinskas, F. W. et J. Lawler, 1994

Figure 5 : Organisation des sous-unités des intégrines. Les sous-unités α et β s'associent pour former un hétérodimère qui constitue l'intégrine fonctionnelle.

Les intégrines sont des protéines transmembranaires interagissant avec certaines composantes de la matrice extracellulaire et sont ainsi impliquées dans l'adhésion cellulaire (Luscinskas et Lawler, 1994 ; van der Flier et Sonnenberg, 2001 ; Sheppard, 2005). En plus de cette fonction, les intégrines ont la capacité d'initier certaines cascades biochimiques de la même façon que les récepteurs à la surface membranaire. Par le biais de ces cascades de signalisation, les intégrines prennent part à des phénomènes cellulaires tels que la prolifération, la survie et la migration (Luscinskas et Lawler, 1994 ; van der Flier et Sonnenberg, 2001 ; Sheppard, 2005). Les ligands des intégrines de la famille α_v sont présentés au tableau III. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ peut également interagir avec des récepteurs membranaires tels que le récepteur PDGFR- β (Borges et al, 2000), le récepteur de l'insuline (Schneller et al, 1997) et le récepteur VEGFR-2 (Borges et al, 2000). Afin de se lier à leurs substrats, les intégrines de la famille α_v reconnaissent le motif RGD dans la séquence de ceux-ci (Smith et Cheresh, 1990).

Tableau III : Liste des ligands des intégrines de la famille α_v

Intégrines		Ligands		
α	β	Matrice extracellulaire	Solubles	Cellule-cellule
α_v	1	Fibronectine, vitronectine	TGF β 1 :LAP	
α_v	3	Fibronectine, vitronectine, facteur de von Willebrand, ostéopontine, tenascine, protéine sialique de l'os, thrombospondine-1	Fibrinogène, Cyr61/IGFBP-10, CTGF de souris, MMP-2, endostatine, angiostatine, tumstatine	ADAM-15, ADAM-23, CD31
α_v	5	Vitronectine, protéine sialique de l'os	TGF β 1 :LAP, Cyr61, endostatine	
α_v	6	Fibronectine et tenascine	TGF β 1 :LAP	
α_v	8	Collagène, laminine, fibronectine	TGF β 1 :LAP	

Adapté de van der Flier, A. et A. Sonnenberg, 2001

Il est à noter que les sous-unités α des intégrines sont sécrétées sous une forme inactive. Elles doivent subir un clivage endoprotéolytique impliquant la furine et la convertase de proprotéines PC5A avant d'exercer leurs multiples fonctions (Lissitzky et al, 2000).

1.1.3.4 La plasmine

La plasmine est la forme active du plasminogène (Ogston, 1980 ; Vassalli et al, 1991 ; Plow et al, 1995). Le plasminogène est une protéine impliquée dans l'homéostasie et la migration cellulaire (Plow et al, 1995). C'est une glycoprotéine d'environ 90 kDa. Le plasminogène est activé par deux enzymes de la famille des activateurs du plasminogène soit uPA (*Urokinase-like Plasminogen Activator*) et tPA (*Tissu-type Plasminogen Activator*) (Ogston, 1980 ; Vassalli et al, 1991). L'activation du plasminogène peut être inhibée par des protéases de type sérine. L'inhibiteur majeur du système du plasminogène est le PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*) (Vassalli et al, 1991).

Une fois clivé par ses activateurs, le plasminogène devient la plasmine. Celle-ci est constituée de deux chaînes polypeptidiques et possède un poids moléculaire d'environ 85 kDa. C'est une enzyme aux propriétés similaires à la trypsine (Ogston, 1980 ; Vassalli et al, 1991 ; Plow et al, 1995).

Le principal substrat de la plasmine est la fibrine, mais elle peut également cliver d'autres protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène, la laminine et la

fibronectine. Elle est également l'activateur de plusieurs métalloprotéases. Ainsi, la plasmine est impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire (Vassalli et al, 1991).

1.1.3.5 Les métalloprotéases

Il existe 24 métalloprotéases, dont 23 se retrouvent chez l'humain (Visse et Nagase, 2003). Ces enzymes peuvent être classées de deux façons : selon leur structure (figure 6) ou selon leurs similitudes dans trois propriétés soit leur spécificité de substrats, leur séquence et l'organisation de leurs domaines. Dans ce dernier mode de classification, on regroupe les métalloprotéases dans six classes : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines, les métalloprotéases transmembranaires et les autres métalloprotéases (Visse et Nagase, 2003).

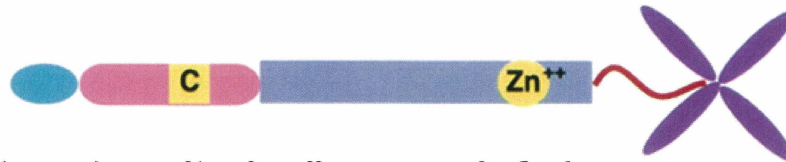
Les métalloprotéases, sécrétées sous la forme de proprotéines inactives, peuvent être activées de deux façons : par un clivage protéolytique, entre autres par les activateurs du plasminogène (Malemud, 2006) et la furine (Bassi et al, 2000 ; Bassi et al, 2001 ; Mercapide et al, 2002 ; Mayer et al, 2003; Bassi et al, 2003 ; Cao et al, 2005a), suivi du relâchement du propeptide, ou par une série de réactions chimiques. Dans le deuxième cas, il y a d'abord une modification chimique du groupement sulfhydrique de la région cystéine de la métalloprotéase qui pourra interagir avec le site de liaison Zn^{2+} . Ensuite, il y a un clivage intramoléculaire suivi du relâchement final du propeptide (Visse et Nagase, 2003).

A. MMPs avec un domaine minimal (MMP-7)

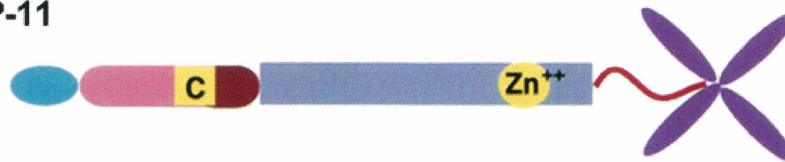


B. MMPs avec un domaine pour l'Hémopexine/Vitronectine

Simple: MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-10, MMP-12, MMP-13, MMP-18, MMP-19, MMP-20



Contenant un site de clivage par la furine
MMP-11



Transmembranaires avec un site de clivage par la furine:
MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25



Contenant une répétition de fibronectines de type II:
MMP-2, MMP-9

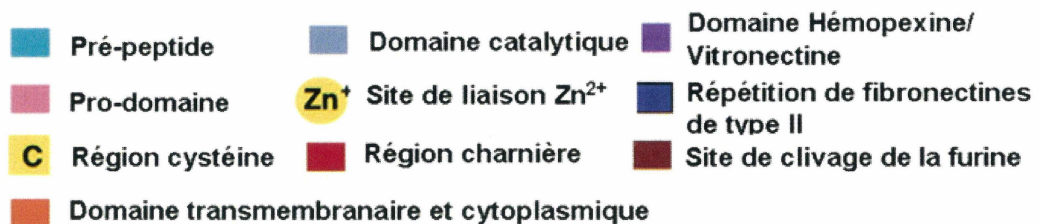
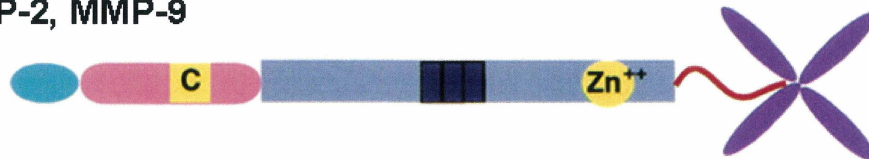


Figure 6 : Structure des métalloprotéases.

Adaptée de Vu, T. H. et Z. Werb, 2000

Tableau IV : Substrats et effets biologiques des métalloprotéases

Effets biologiques	Métalloprotéases impliquées	Substrats clivés	Références
Migration des kératinocytes et ré-épithélialisation	MMP-1	Collagène type I	Pilcher et al, 1997
Activation des ostéoclastes	MMP-13	Collagène type I	Holliday et al, 1997
Croissance des neurites	MMP-2	Sulfate de chondroïtine du protéoglycan	Krekoski et al, 2002
Différenciation des adipocytes	MMP-7	Fibronectine	Fukai et al, 1995
Migration cellulaire	MMP-1, MMP-2, MMP-3	Fibronectine	Fukai et al, 1995
Migration cellulaire	MT1-MMP	CD44	Kajita et al, 2001
Apoptose des cellules épithéliales mammaires	MMP-3	Membrane basale	Boudreau et al, 1995
Formation des alvéoles épithéliales mammaires	MMP-3	Membrane basale	Sympson et al, 1994 ; Witty et al, 1995
Transition épithéliale à mésenchymale	MMP-3	E-cadhérine	Lochter et al, 1997 ; Thomasset et al, 1998
Différenciation des cellules mésenchymales avec un phénotype inflammatoire	MMP-2	Pas identifié	Turck et al, 1997
Agrégation plaquettaire	MMP-1	Pas identifié	Sawicki et al, 1997
Génération de fragments similaires à l'angiotatine	MMP-3	Plasminogène	Lijnen et al, 1998
	MMP-7	Plasminogène	Patterson et Sang, 1997
	MMP-9	Plasminogène	Patterson et Sang, 1997
	MMP-12	Plasminogène	Dong et al, 1997
Génération de fragments similaires à	MMPs	Collagène type VIII	Lin et al, 2001

l'endostatine			
Augmentation de l'affinité du collagène	MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-13	BM-40	Sasaki et al, 1997
Tubulogénèse des reins	MT1-MMP	Collagène type I	Kadono et al, 1998
Relâche de FGFb	MMP-3, MMP-13	Perlecane	Whitelock et al, 1996
Augmentation de la biodisponibilité de l'IGF-1	MMP-1, MMP-2, MMP-3	IGFBP-3	Fowlkes et al, 1994
Prolifération cellulaire	MMPs	IGFBP-5	Thrallkill et al, 1995
	MMP-11	IGFBP-1	Manes et al, 1997
Activation de VEGF	MMPs	CTGF	Hashimoto et al, 2002
Migration des cellules épithéliales	MMP-2, MT1-MMP	Chaîne 5 γ 2 de la laminine	Giannelli et al, 1997 ; Koshikawa et al, 2000
Apoptose des cellules épithéliales	Collagénases	Collagène type I	Lei et al, 1996
Pro-inflammatoire	MMP-1, MMP-3, MMP-9	Maturation de l'Il-1 β de son précurseur	Schonbeck et al, 1998
Résistance des cellules tumorales	MMP-9	ICAM-1	Fiore et al, 2002
Anti-inflammatoire	MMP-1, MMP-2, MMP-9	Dégradation de l'Il-1 β	Ito et al, 1996
Anti-inflammatoire	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13, MMP-14	MCP-3	McQuibban et al, 2000 ; McQuibban et al, 2002
Augmentation de la biodisponibilité du TGF β	MMP-2, MMP-3, MMP-7	Décorine	Imai et al, 1997
Arrêt de l'agrégation cellulaire et augmentation de l'invasion cellulaire	MMP-3, MMP-7	E-cadhérine	Noe et al, 2001
Diminution de l'adhésion cellulaire	MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP	Transglutaminase tissulaire de la surface cellulaire	Belkin et al, 2001
Apoptose médiée par Fas	MMP-7	FasL	Powell et al, 1999
Réduction de la réponse à l'Il-2	MMP-9	Il-2R α	Sheu et al, 2001

Adapté de Visse, R. et H. Nagase, 2003

Il est à noter que certaines métalloprotéases sont inhibées par un clivage. C'est le cas de la MMP-2 qui peut être inactivée par la furine dans le réseau trans-golgien (Cao et al, 2005a).

Les métalloprotéases se retrouvent dans la matrice extracellulaire où elles exercent plusieurs fonctions une fois activées. Lorsqu'elles sont impliquées dans les interactions entre les cellules, elles peuvent activer des cascades de protéases, maturer des inhibiteurs de protéases, relâcher des facteurs de croissance tels que le TGF β (Yu et Stamenkovic, 1999 ; McMahon et al, 2003), maturer des chimiokines, tronquer des récepteurs de facteurs de croissance tels que le récepteur du TNF- α et cliver des molécules d'adhésion. Lorsqu'elles agissent plutôt au niveau des interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire, elles peuvent induire la dissolution de la matrice extracellulaire, le relâchement de facteurs bioactifs et la libération de facteurs de croissance (Vu et Werb, 2000 ; Lee et Murphy, 2004). Ayant des rôles aussi variés, les métalloprotéases ont de nombreux substrats. Les rôles biologiques des métalloprotéases et leurs substrats impliqués sont présentés au tableau IV. Les métalloprotéases peuvent également être impliquées dans plusieurs processus pathologiques comme la chondrodysplasie, l'athérosclérose, l'arthrite, la sclérose en plaques et le cancer (Malemud, 2006).

Les métalloprotéases peuvent être inhibées par les TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*). On en compte quatre chez les vertébrés soient TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4 (Vu et Werb, 2000 ; Visse et Nagase, 2003 ; Lee et Murphy, 2004) qui ont des poids moléculaires variant entre 21 et 29 kDa. Tous les TIMPs ont la

capacité d'inhiber l'ensemble des métalloprotéases, excepté TIMP-1 qui n'interagit pas avec la MT1-MMP. Enfin, TIMP-3 est également en mesure d'inhiber quelques protéases de la famille ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*) (Visse et Nagase, 2003).

1.1.4 Les voies de signalisation du TGF β

Le TGF β possède six types de récepteurs par lesquels il peut induire sa signalisation intracellulaire. On retrouve le T β R-I de 53 kDa, le T β R-II de 75 kDa, le T β R-III ou bétaglycan de 280 à 310 kDa, le T β R-IV de 180 kDa, le T β R-V ou LRP-1 ou α_2 MR de 400 kDa et le T β R-VI de 180 kDa (O'Grady et al, 1991 ; Yamashita et al, 1995). Afin d'être totalement activés et d'exercer pleinement leurs fonctions respectives, ces récepteurs doivent être fucolysés par l'enzyme FucT VIII (*GPD-L-Fuc : N-acétyl- β -D-glucosaminide- α 1,6-fucosyltransférase VIII*) sur leur N-glycan (Wang et al, 2005 ; Schachter, 2005). L'importance de la fucosylation de ces récepteurs a été mise en évidence chez des souris atteintes d'emphysème. L'ajout de TGF β chez les souris normales pour l'enzyme FucT VIII réduit les symptômes d'emphysème par une inhibition de l'expression des MMPs. Par contre, l'ajout de TGF β chez les souris déficientes pour cette enzyme n'entraîne aucune amélioration des symptômes puisque la signalisation des récepteurs T β Rs est fortement inhibée (Wang et al, 2005).

Le T β R-I a été identifié pour la première fois en 1984 (Frolik et al, 1984). On compte deux principaux récepteurs de type I dans la signalisation du TGF β soit le récepteur ALK-1 (*Activin Like Kinase*) et le récepteur ALK-5 (de Caestecker, 2004). Ces deux récepteurs agissent comme des antagonistes. Le récepteur ALK-1 est impliqué dans l'induction de la prolifération et de la migration des cellules alors que le récepteur ALK-5 inhibe ces deux activités (Goumans et al, 2002 ; Goumans et al, 2003a ; Goumans et al, 2003b). Cet antagonisme est important dans certaines fonctions du TGF β dont la formation des vaisseaux sanguins. Dans les processus de vasculogénèse et d'angiogénèse, lorsque le TGF β signale par le récepteur ALK-1, il induit la prolifération des cellules endothéliales. Lorsqu'il signale plutôt par le récepteur ALK-5, il induit la différenciation des cellules endothéliales et des péricytes (Armulik et al, 2005). C'est le niveau d'expression du récepteur ALK-1 qui détermine quelle sera la voie de signalisation privilégiée. En fait, le niveau d'expression du récepteur ALK-5 est toujours constant. Lors de la signalisation, le TGF β se lie d'abord au T β R-II dont l'activité kinase est constitutivement active (de Caestecker, 2004). Celui-ci recrute ensuite ALK-5 qui est nécessaire à la suite de la cascade. ALK-5 peut alors recruter ALK-1 dans le complexe des récepteurs. C'est la stoechiométrie entre ALK-5 et ALK-1 qui déterminera la direction du signal (Goumans et al, 2003).

Le T β R-II a pour rôle de recruter et d'activer le T β R-I. Lorsque le TGF β se lie au T β R-II, ce dernier est en mesure de recruter le T β R-I (Di Guglielmo et al, 2003). Ensuite, il phosphoryle le T β R-I sur plusieurs régions GS faisant ainsi disparaître le site de liaison

pour FKBP12 qui stabilise normalement le T β R-I dans sa forme inactive (Huse et al, 2001). Le T β R-I peut dès lors initier la cascade de signalisation intracellulaire.

Le T β R-III a été découvert en 1992 dans une lignée de choriocarcinome trophoblastique (Mitchell et al, 1992). C'est un récepteur ayant pour fonction d'inhiber les voies de signalisation du TGF β . Le T β R-III s'associe d'abord au TGF β , puis le complexe se lie au T β R-II empêchant ainsi la liaison du T β R-I, le récepteur induisant la cascade de signalisation intracellulaire (Eickelberg et al, 2002). De cette façon, les cellules ayant de forts niveaux de bétaglycans répondent moins bien au TGF β .

Le T β R-IV a été identifié en 1988 chez les cellules pituitaires de type GH₃ par l'équipe du Dr Massagué (Cheifetz et al, 1988). Il semble n'être exprimé que dans quelques types cellulaires tels que les fibroblastes, les cellules d'adénocarcinome de poumon et les cellules de carcinome squameux de la bouche. De plus, on ne connaît pas encore sa fonction exacte. On sait toutefois qu'il ne se lie pas au récepteur T β R-II pour induire sa signalisation et qu'il est capable de lier l'activine AB et l'inhibine B en plus du TGF β (Yamashita et al, 1995).

Le T β R-V a été identifié en 1991 (O'Grady et al, 1991). Il semble être impliqué dans une voie de signalisation parallèle à celle du complexe T β R-I:T β R-II et contrôler la prolifération cellulaire. En fait, ce récepteur permettrait l'inhibition de la prolifération cellulaire par le TGF β alors que la voie induite par le complexe T β R-I:T β R-II serait plutôt associée à une augmentation de la prolifération cellulaire (Huang et Huang, 2005).

Afin de moduler la prolifération cellulaire, le TGF β se lie à ses récepteurs par son site actif⁵²WSLD⁵⁵ (Huang et al, 1999).

Chez les cellules endothéliales, on retrouve un septième récepteur, soit l'endogline, ou facteur CD105, qui fait 180 kDa (Cheifetz et al, 1992 ; Yamashita et al, 1995, Armulik et al, 2005 ; Lebrin et al, 2005). Ce récepteur a été découvert en 1985 par l'équipe du Dr Letarte (Quackenbush et Letarte, 1985 ; Gougos et Letarte, 1988). L'expression de ce récepteur est induite dans les zones hypoxiques par le facteur HIF-1 (Sanchez-Elsner et al, 2002). L'endogline se complexe au TGF β avec le récepteur ALK-1 pour induire la prolifération des cellules endothéliales et la production de TGF β dans ces mêmes cellules, favorisant ainsi la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Lebrin et al, 2004 ; Armulik et al, 2005).

Tous ces récepteurs permettent la signalisation du TGF β . La principale voie de signalisation intracellulaire induite par le TGF β est celle des Smads.

1.1.4.1 La voie des Smads

Une fois complexé au T β R-II, le récepteur T β R-I a une activité sérine/thréonine kinase (Huse et al, 2001 ; Guglielmo et al, 2003 ; Derynck et Zhang, 2003 ; Lux et al, 2005, Lebrin et al, 2005 ; Feng et Derynck, 2005). Cette activité enzymatique lui permet de phosphoryler les R-Smads (Smad2 et Smad3) qui sont recrutés à la membrane par

SARA (*Smad Anchor for Receptor Activation*) (Massagué, 2000 ; Guglielmo et al, 2003 ; Derynck et Zhang, 2003 ; Massagué et al, 2005 ; Feng et Derynck, 2005). En effet, la protéine SARA peut se lier directement au domaine MH2 des Smads et les recruter à la membrane par une interaction entre son domaine FYVE (*Fab1p, Yotb, Vac1p et EEA1*) et le PIP₃ membranaire (Guglielmo et al, 2003).

Il est à noter que d'autres protéines adaptatrices peuvent exercer le même type de fonction que SARA et relier les Smads aux récepteurs du TGFβ. Une de ces protéines mieux connues est Dab2 (*Disabled-2*) qui interagit avec les récepteurs TβR-I et TβR-II pour augmenter la phosphorylation de Smad2 (Hocavar et al, 2001).

Une fois phosphorylés, les R-Smads se complexent avec le Co-Smad, Smad4, pour ensuite transloquer au noyau et induire la transcription de plus de 500 gènes (Massagué, 2000 ; Derynck et Zhang, 2003 ; Massagué et al, 2005 ; Feng et Derynck, 2005). La voie des Smads est illustrée à la figure 7.

Il existe plusieurs inhibiteurs de la voie des Smads. Le plus connu est le I-Smad Smad7. C'est en 1997 que Smad7 a été reconnu en tant qu'inhibiteur de la voie des Smads induite par TGFβ (Nakao et al, 1997). Smad7 agit en fait à la manière d'un antagoniste des R-Smads au niveau du récepteur TβR-I (Hayashi et al, 1997). Son expression est induite directement par le TGFβ par différentes voies de signalisation dont la voie des Smads, principalement par une collaboration entre Smad3 et TFE3, la voie de Ap-1 et la voie des MAPKs (Afrakhte et al, 1998 ; Itoh et al, 1998 ; von Gersdorff et al, 2000 ;

Brodin et al, 2000 ; Hua et al, 2000 ; Uchida et al, 2001). Le TGF β peut donc moduler lui-même son expression.

Parmi les autres répresseurs de la voie des Smads, on peut citer FKBP12 (Huse et al, 2001), les ubiquitines ligases Smurf1 et Smurf2 (Koinuma et al, 2003 ; Ohashi et al, 2005 ; Massagué et al, 2005) qui envoient les récepteurs activés et les R-Smads au protéasome, le pseudorécepteur BAMBI qui empêche la formation du complexe T β R-I :T β R-II (Onichtchouk et al, 1999 ; Chen et Meng, 2004 ; Massagué et al, 2005), les TGIFs qui compétitionnent avec des co-activateurs de la voie (Wotton et Massagué, 2001; Feng et Derynck, 2005) et Ski et SnoN qui peuvent séparer les R-Smads du Co-Smad (Stroschein et al, 1999 ; Wang et al, 2000 ; Wu et al, 2002 ; Chen et Meng, 2004 ; Sarker et al, 2005 ; Krakowski et al, 2005).

Il existe aussi plusieurs activateurs de la voie des Smads du TGF β . D'abord, Arkadia, une ubiquitine ligase E3, amplifie la signalisation du TGF β par la voie des Smads en se liant à Smad7 pour induire sa dégradation par le protéasome. Arkadia fait partie de la voie de signalisation de *Nodal*, un membre de la superfamille du TGF β (Koinuma et al, 2003).

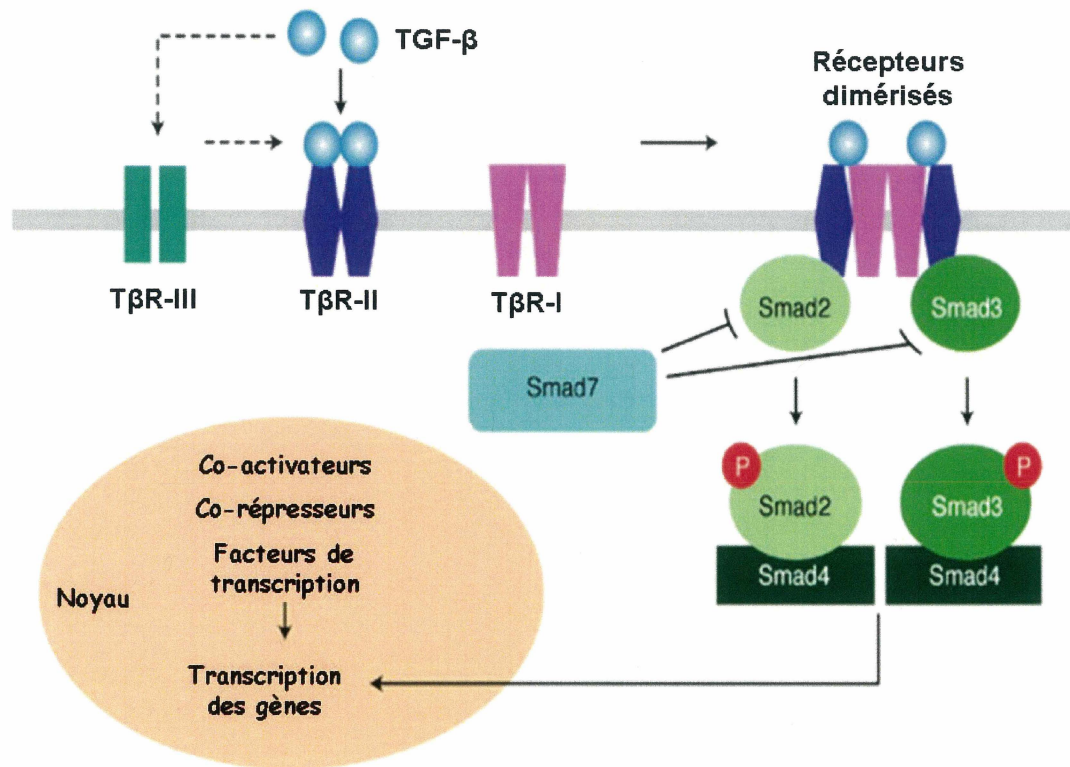
Le régulateur de transcription LMO4 (LiM-Only factor 4), retrouvé spécifiquement chez les cellules épithéliales, est un autre activateur de la voie des Smads. Il interagit avec Smad2 et, dans une moindre mesure, avec Smad4 pour faciliter leur liaison sur certains promoteurs des gènes cibles du TGF β dont le gène de PAI-1 (Lu et al, 2006). De cette

façon, il facilite l'inhibition de la prolifération médiée par le TGF β dans les cellules épithéliales (Lu et al, 2006).

Parmi les autres activateurs de la voie des Smads, on compte CBP/p300 (Feng et al, 2002 ; de Caestecker et al, 2000) et GCN5 (Kahata et al, 2004) qui module la structure de la chromatine et facilite ainsi la transcription des gènes cibles du TGF β , SKIP qui contrecarre la répression médiée par Ski et SnoN et interagit avec Smad3 (Leong et al, 2001), SMIF (Bai et Cao, 2002) qui amplifie les fonctions de Smad4, Swift (Shimizu et al, 2001) qui augmente la transactivation de Smad2 et Zeb1 (Postigo et al, 2003) qui aide à la formation d'un complexe entre les Smads et p300 (Feng et Denrynk, 2005).

1.1.4.2 Les autres voies de signalisation

Bien que la voie de signalisation principale du TGF β soit la voie des Smads, celui-ci peut induire d'autres voies par son récepteur T β R-1. Une de ces voies est celle de la PI3K (*Phosphatidyl Inositol-3-phosphate Kinase*). Le T β R-I peut en effet activer la PI3K qui active ensuite AKT. La kinase p38 est ensuite activée par AKT et peut induire l'expression de différents gènes (Higaki et Shimokado, 1999 ; Bakin et al, 2000 ; Lhuillier et Dryer, 2002 ; Bakin et al, 2002) dont ATF-2, un activateur de la cycline D1 impliquée dans le cycle cellulaire et un inducteur de la chaîne lourde de la myosine (Lim et al 2005 ; Takasawa et al, 2006).



Adaptée de Pinzani M. et al, 2001.

Figure 7 : La voie des Smads. Le TGFβ se lie au récepteur TβR-II qui recrute et active le récepteur TβR-I. Ce dernier phosphoryle Smad2 et Smad3 qui se complexent alors avec Smad4. Les complexes Smad2 :Smad4 et Smad3 :Smad4 transloquent ensuite au noyau pour induire la transcription de plusieurs gènes.

Le T β R-I peut aussi activer la protéine polaire Par6. Cette dernière se complexe avec Smurf1 pour inhiber RhoA (Wang et al 2003 ; Ozdamar et al, 2005 ; Moustakas et Heldin, 2005). On sait que RhoA peut activer ROCK et Limk-2 qui est un inhibiteur de la cofiline-1 (Huber et al, 2005). La protéine ROCK est impliquée dans la migration amoéboïde et la cofiline-1 est un inhibiteur de la désorganisation des filaments d'actine (Moustakas et Heldin, 2005 ; Sahai et Mashall, 2003 ; Friedl, 2004).

Les voies de signalisation du TGF β peuvent interagir avec plusieurs autres voies. D'abord, la voie des Smads peut induire la transcription de plusieurs gènes dont Snail, impliqué dans la transition d'un type cellulaire épithélial vers un type mésenchymal et p15 et p21, qui inhibent la prolifération cellulaire (Robson et al, 1999 ; Rich et al, 1999 ; Peinado et al, 2003). Ces gènes peuvent être modulés par une panoplie de voies de signalisation. Snail est activé par les voies de Shh (*sonic hedgehog*) (Li et al, 2006b), STAT3 (Jechlinger et al 2003), Ras, Delta/Jagged et INF- γ et il est inhibé par la voie de Wnt (Huber et al, 2005). Les gènes régulateurs du cycle cellulaire p15 et p21 sont activés par la voie de Delta/Jagged (Huber et al, 2005).

La voie des Smads mène également à l'induction de l'expression de la furine. Cette dernière peut maturer le PDGF (Siegfried et al, 2003 ; Seigfried et al, 2005), un gène impliqué dans l'activation de la voie de Ras (Gupta et al, 2001 ; Huber et al, 2005).

Ensuite, la PI3K activé par le T β R-I peut inhiber la GSK3 β de la voie de Wnt et ainsi rendre la β -caténine active (Sanchez et al, 2001 ; Gong et al, 2005 ; Huber et al, 2005).

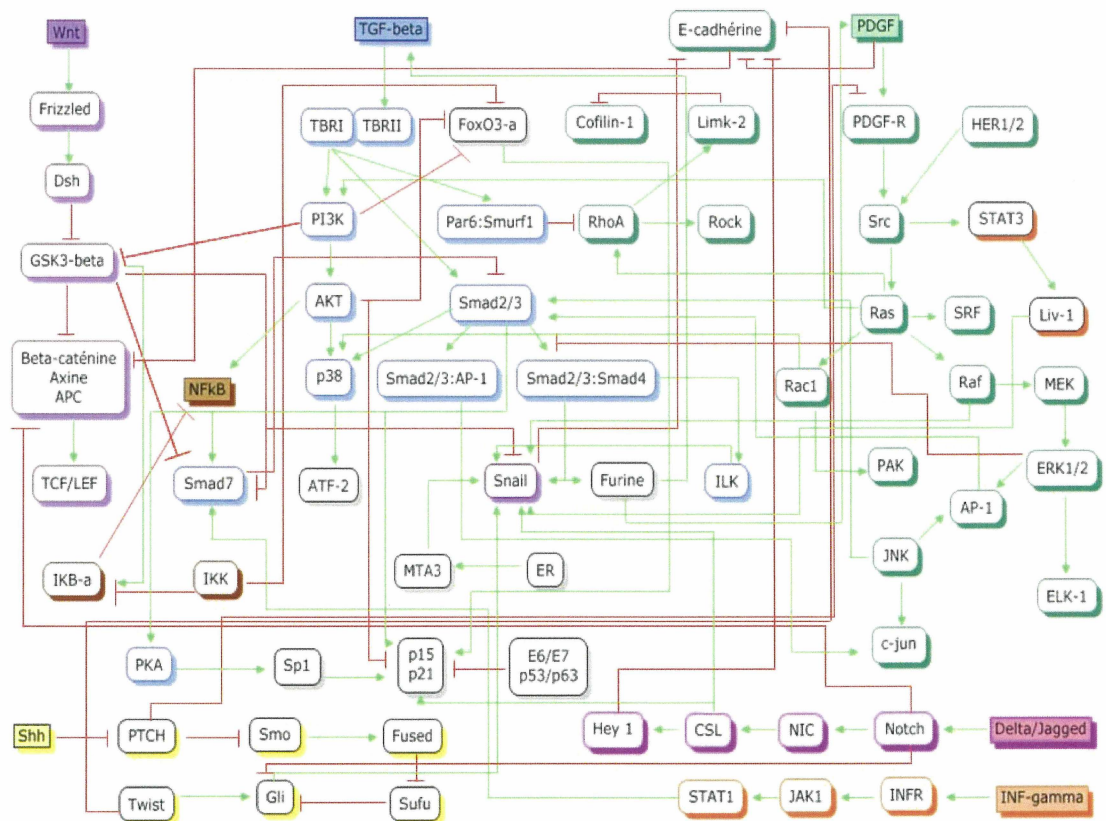


Figure 8 : Interactions entre les voies du TGF β et les voies Wnt, Shh, Delta/Jagged, INF- γ , STAT3 et Ras. Les flèches vertes représentent les activations et les flèches rouges, les inhibitions.

Le facteur de transcription ERK1/2 de la voie de Ras peut pour sa part inhiber la voie des Smads en empêchant la formation du complexe des R-Smads avec Smad4 (Kretzschmar et al, 1999). Enfin, NFκB induit par AKT peut inhiber la voie des Smads en stimulant l'expression de Smad7 par CD40 (Patil et al, 2000).

D'autres interactions entre les voies de signalisation mènent à une activation de ces voies ou à des phénomènes de synergie. Le facteur AP-1 peut s'associer aux R-Smads et former un complexe de facteurs de transcription capable d'induire l'expression de c-jun (Verrecchia et al, 2001a). Par la suite, c-jun peut former un complexe avec Smad3 et induire l'expression de gènes cibles du TGFβ dont PAI-1 (Verrecchia et al, 2001b). Le facteur de transcription JNK peut stimuler la phosphorylation des R-Smads et ainsi activer la voie des Smads (Engel et al, 1999 ; Mori et al, 2004). Le TGFβ peut aussi activer JNK. Toutefois, la voie exacte impliquée dans cette activation n'est pas encore très bien définie. Une voie possible serait celle de p38 (Hocevar et al, 1999) induit entre autres par le Smad3 (Leivonen et al, 2006). La synthèse de fibronectine induite par le TGFβ passerait par cette voie impliquant JNK (Hocevar et al, 1999).

La figure 8 présente les principales interactions entre les différentes voies présentées dans cette section.

1.1.5 Les rôles du TGF β

Le TGF β est impliqué dans le développement, l'hématopoïèse, l'angiogénèse, la réponse immunitaire et l'apoptose. On le retrouve aussi dans plusieurs manifestations pathologiques.

Pendant l'embryogenèse, trois isoformes du TGF β , soit le TGF β 1, le TGF β 2 et le TGF β 3, agissent en coopération dans le développement craniofacial. Ils sont impliqués dans la formation du palais et plus précisément dans la fusion médiane épithéliale (Blobe et al, 2000 ; Chang et al, 2002). Ils participent en fait à l'alignement horizontal du palais, à la condensation du tissu mésenchymateux et aux processus subséquents de myogenèse, de chondrogenèse et d'ostéogenèse (Chang et al, 2002).

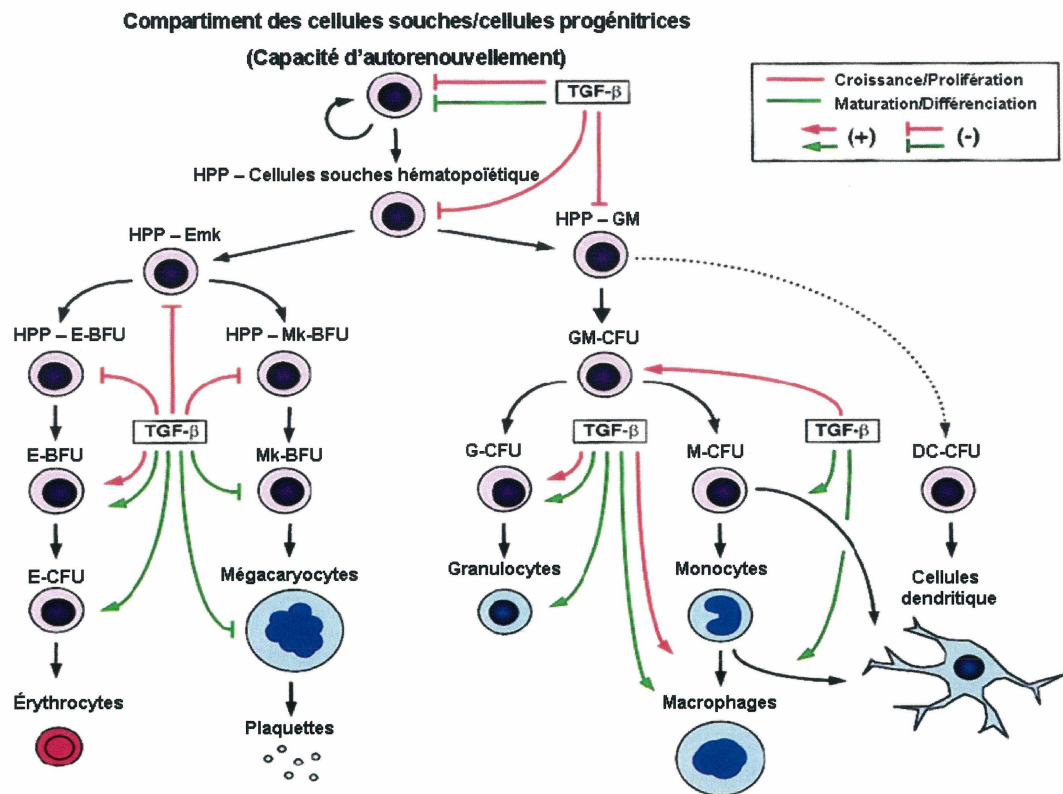
Le TGF β est aussi impliqué dans l'hématopoïèse. Les progéniteurs des cellules hématopoïétiques expriment le récepteur de surface c-kit qui est impliqué dans la différenciation, la prolifération et la survie des cellules. Le TGF β inhibe l'expression de c-kit et maintient ainsi les progéniteurs des cellules hématopoïétiques dans un état de quiescence (Dubois et al, 1994 ; Sansilvestri et al, 1995). En maintenant les cellules souches et les progéniteurs des cellules hématopoïétiques dans cet état non prolifératif, le TGF β les protège des agents toxiques ciblant la cellule en progression dans leur cycle cellulaire tels que le 5-fluorouracil utilisé en chimiothérapie (Fortunel et al, 2000). Cette régulation par le TGF β permet de maintenir les réserves de cellules souches (Ruscetti et al, 2005). Le TGF β peut moduler plusieurs autres récepteurs de cytokines à la surface

des cellules souches et des cellules progénitrices pour contrôler leur cycle cellulaire. Par exemple, il peut inhiber l'expression du récepteur de l'Il-1 (Dubois et al, 1990), du récepteur FLT3 et du récepteur de l'Il-6 (Fortunel et al, 2000).

Le TGF β prend également part à l'érythropoïèse, au développement de la lignée des monocytes et des macrophages, au développement des cellules dendritiques et à la mégakaryopoïèse. L'implication du TGF β dans ces processus est illustrée à la figure 9.

Le TGF β est aussi impliqué dans l'angiogénèse par sa liaison sur les récepteurs de type I ALK-1 et ALK-5 tel que décrit plus tôt. Selon l'équilibre entre ALK-1 et ALK-5 et l'implication de l'endogline qui favorise la signalisation par ALK-1 (Pece-Barbara et al, 2005), le TGF β peut induire ou inhiber la prolifération et la migration des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses vasculaires et la synthèse de la membrane extracellulaire (Bertolino et al, 2005 ; Lebrin et al, 2005). Il induit également la différenciation des péricytes (Armulik et al, 2005) et est associé à une meilleure résistance des vaisseaux sanguins puisqu'il augmente l'expression du récepteur VEGFR-1 et de SMA- α (*Smooth Muscle Actin*) chez les péricytes (Shih et al, 2003).

Le TGF β est également impliqué dans la réponse immunitaire. Il agit d'abord au niveau des thymocytes et des lymphocytes T (Letterio, 2005). Il inhibe la croissance et la prolifération des thymocytes et participe à l'inhibition de la croissance des thymocytes triplement négatifs (Letterio, 2005). Il induit aussi la tolérance immune des lymphocytes T CD8⁺ (Zhang et al, 2006).



Adaptée de Fortunel, N. O. et al, 2000

Figure 9 : Implication du TGF β dans l'hématopoïèse.

Le TGF β peut inhiber la croissance et la prolifération des progéniteurs des cellules hématopoïétiques HPP-Emk (Progéniteur commun des érythroblastes et des mégacaryocytes à haut potentiel prolifératif), HHP-E-BFU (Progéniteur des érythrocytes à haut potentiel prolifératif), HPP-Mk-BFU (Progéniteur des mégacaryocytes à haut potentiel prolifératif) et favoriser la croissance et la prolifération du GM-CFU (Progéniteur commun des granulocytes et des monocytes). Il peut également inhiber la croissance et la prolifération des cellules souches hématopoïétiques ou leur maturation et leur différenciation selon le cas. Il favorise de plus la maturation des érythrocytes, des granulocytes, des monocytes et des macrophages alors qu'il inhibe celle des plaquettes. Il favorise enfin la différenciation des monocytes en cellules dendritiques.

Le TGF β est aussi important pour le maintien des lymphocytes T régulateurs. Il permet de maintenir l'expression du facteur Foxp3 à la surface des cellules T régulatrices et l'activité suppressive de celles-ci (Marie et al, 2005). Il agit également de concert avec les lymphocytes T régulateurs pour inhiber l'activité cytotoxique des cellules NK (*Natural Killer*) (Ghiringhelli et al, 2005).

Le TGF β peut induire l'apoptose des cellules. Il peut emprunter différentes voies dans ce sens. D'abord, il permet l'expression de plusieurs facteurs impliqués dans l'apoptose dont le facteur pro-apoptotique Bim, le facteur de transcription AP-1 et les ARTS qui comprennent Smac et Diablo et en inhibe d'autres dont les inhibiteurs des caspases XIAPs, le facteur anti-apoptotique Bcl-xL et le facteur de transcription NF κ B (Lee et Bae, 2002 ; Ohgushi et al 2005).

Ensuite, pour induire l'apoptose, le TGF β active la voie de PI3K et des Smads. Les Smads peuvent stimuler directement l'apoptose par la transcription de gènes pro-apoptotiques dont les TIEGs, Dapk et Ship (Moustakas et Heldin, 2005) ou induire la voie de JNK (Lee et Bae, 2002) qui permet l'activation des facteurs pro-apoptotiques Bim et Bcl2 (Martin et Vuori, 2004). La voie de la PI3K mène pour sa part à l'activation de Akt qui peut induire l'expression de NF κ B qui augmente l'expression de Smad7 (Patil et al, 2000). L'inhibiteur Smad7 peut amplifier la cascade de signalisation de JNK et de p38 par l'activation de TAK1, (Moustakas et Heldin, 2005) ce qui a pour effet d'augmenter encore le signal d'apoptose. Il peut également former un complexe avec la

β -caténine et les facteurs de transcription LEF-1 et TCF-4 pour induire un signal de mort cellulaire. De plus, le TGF β peut inhiber l'action de la GSK3 β par la voie de la PI3K et ainsi permettre une plus grande accumulation de β -caténine dans la cellule (Edlund et al, 2005).

Le TGF β est aussi associé à plusieurs pathologies. Par exemple, une surexpression de la forme latente du TGF β entraîne le développement d'inflammations cutanées de type T_H1 similaires au psoriasis (Li et al, 2004). De plus, comme il est associé à la synthèse de la matrice extracellulaire, il peut entraîner l'apparition de différents types de fibroses dont la sclérodermie et les kéloïdes lors d'une surexpression (Leask et Abraham, 2004 ; Javelaud et Mauviel, 2004). Il est aussi impliqué dans le processus inflammatoire associé à la fibrose pulmonaire induite par l'amiante. En fait, le TGF β inhibe la production de TNF- α par les macrophages alvéolaires pendant cette inflammation (Lemaire et Ouellet, 1996).

Le TGF β joue également un rôle dans la télangiectasie héréditaire hémorragique. Lorsqu'il y a des mutations dans les gènes encodant l'endogline et le récepteur ALK-1 qui rendent ces deux récepteurs non fonctionnels ou simplement absents des cellules endothéliales, la pathologie se développe. Elle résulte d'une dysplasie vasculaire et de malformations des vaisseaux sanguins (Blobe et al, 2000).

Le TGF β est aussi fortement impliqué dans le cancer. Ce sujet sera discuté dans la section suivante.

1.2 Le cancer

Le cancer est la deuxième cause de mortalités en Amérique du Nord (Kreiger et al, 2003). En 2002, on estimait à 1,5 millions le nombre de nouveaux cas observés aux États-Unis par année (Patrick et al, 2003). À ce moment, l'augmentation de cas de cancers annuels estimée pour 2010 était de 40% (Kreiger et al, 2003). Sachant que 60% des personnes ayant reçu le diagnostic d'un cancer dans l'année survivra pendant au moins cinq ans, cette maladie génère des dépenses annuelles immenses à l'échelle mondiale (Kreiger et al, 2002 ; Patrick et al, 2003). Il est donc important de bien connaître les causes ou les facteurs de risque du cancer pour être en mesure de le prévenir.

1.2.1 Définition du cancer

Le cancer est un problème de prolifération anarchique d'une cellule qui a acquis à la fois un avantage de prolifération et un avantage de survie (Melnick et al, 1993). La cellule peut acquérir ces avantages à la suite de mutations dans son ADN qui peuvent être causées par des produits chimiques, des virus ou des radiations (Todaro et Huebner, 1972 ; Melnick et al, 1993 ; Kreiger et al, 2003). Ces bris entraînent l'activation de proto-oncogènes ou l'inhibition de suppresseurs de tumeurs (Rüegg, 2006). Normalement, ces bris peuvent être réparés par la machinerie de réparation de l'ADN, mais si le système de surveillance du génome, incluant le régulateur p53, ou du cycle cellulaire fait défaut, les bris se transmettent aux cellules filles et il peut y avoir développement d'une tumeur (Melnick et al, 1993). Les personnes immunosupprimées sont également plus à risque de développer une tumeur maligne puisque la surveillance de l'intégrité des cellules est

diminuée (Good, 1972). De plus, les cellules tumorales expriment des antigènes tumoraux issus de mutations des gènes codant pour des protéines cellulaires constitutives, de la surexpression d'antigènes du soi, de protéines virales ou de marqueurs de différenciation. Ces antigènes induisent les réponses cytotoxiques du système immunitaire (Jäger et al, 2001). Les personnes immunosupprimées ne bénéficient pas de cette première ligne de défense contre le développement tumoral.

Les cellules tumorales peuvent déjouer le système immunitaire pour pouvoir progresser vers un cancer. La défense antitumorale est de type T_H1 et implique les lymphocytes T $CD8^+$, les cellules NK et les macrophages. Or, dans l'environnement tumoral, il y a très peu d'IL-12, ce qui inhibe la réponse de type T_H1 au profit d'une réponse de type T_H2 (Kidd, 2003). De plus, les cellules tumorales peuvent produire de la prostaglandine E_2 (PGE_2) qui inhibe la polarisation des cellules dendritiques vers un phénotype T_H1 . Les cellules dendritiques stimulées par la PGE_2 adoptent plutôt un phénotype T_H2 . Les cellules dendritiques stimulées à la fois par l'IL-10, une cytokine pouvant se retrouver dans l'environnement tumoral, et la PGE_2 adoptent un phénotype T_H3 et stimulent les lymphocytes T régulateurs (Kidd, 2003). Ces lymphocytes produisent de l'IL-10 et du $TGF\beta$, deux cytokines immunosuppressives. Ainsi, les réponses T_H1 et T_H2 sont toutes deux inhibées. Ces stratégies des cellules tumorales permettent le développement d'un cancer par l'inhibition de l'immuno-surveillance (Kidd, 2003).

1.2.2 Les causes du cancer

Les causes du cancer sont très variées. Tout ce qui peut entraîner des mutations dans l'ADN pour permettre à une cellule d'acquérir un avantage de prolifération et de survie constitue une cause potentielle de cancer. Les instabilités chromosomiques constituent un type de dommages à l'ADN qui peut mener à un cancer. Un de ces problèmes est associé aux télomères. Lorsqu'une terminaison des télomères, des répétitions télomériques ou les télomères entiers sont perdus, les cellules peuvent développer une capacité de prolifération anarchique (Bailey et Murnane, 2006).

D'autres cancers sont causés par des agents pathogènes. On compte plusieurs virus oncogéniques. On les classe en deux catégories soit les virus à ADN qui regroupent le *Papillomavirus*, les *Polyomavirus*, le SV40, les *Adénovirus* et les *Herpesvirus*, dont le *Epstein-Barr Virus* (EBV), et les virus à ARN dont le *Avian Leukemia-Sarcoma Virus* (Green, 1972). D'autres cancers peuvent être associés à une infection chronique par une bactérie. C'est le cas du lymphome gastrique de type B qui est souvent associé à la présence de la bactérie *Helicobacter pylori* (Hellmig et al, 2004 ; Schottenfeld et Beebe-Dimmer, 2006).

Il existe aussi plusieurs causes environnementales favorisant le développement d'un cancer. Parmi ces facteurs, on peut citer l'amiante, les benzènes, les dioxines, les sites d'enfouissement contaminés, les ondes électromagnétiques, la cigarette, les métaux lourds, les émanations de combustibles fossiles, les polluants organiques, les pesticides, les phthalates, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les ondes des fréquences

radiophoniques, le radon, les composés organiques volatils, les trihalométhanes issus de la désinfection de l'eau et les radiations ultraviolettes (Kreiger et al, 2003).

1.2.3 Le développement et la progression du cancer

Le cancer amorce son développement lorsqu'une cellule somatique a accumulé plusieurs altérations génétiques qui lui confèrent des avantages de survie et de prolifération (Caldas, 1998). Les cellules issues de celle-ci peuvent développer une résistance à l'anoïkose, l'apoptose cellulaire induite par la perte de contact (Liotta et Kohn, 2004). Il a été démontré que dans les cas de cancers épithéliaux, les cellules peuvent acquérir le gène encodant la protéine TrkB. Le ligand du récepteur TrkB est le facteur BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*). Les cellules cancéreuses exprimant le TrkB répondent au BDNF et acquièrent ainsi un potentiel prolifératif et une résistance à l'anoïkose (Liotta et Kohn, 2004). Il peut alors y avoir développement de la tumeur primaire.

À la suite de la formation de la tumeur primaire, les cellules tumorales commencent normalement à se différencier. Les intégrines à la surface des cellules tumorales activent les kinases ILK et FAK. La kinase FAK, une fois activée, induit l'expression de v-Src qui phosphoryle la E-cadhérine pour stimuler son internalisation. La kinase ILK active induit plutôt l'expression de Snail, un inhibiteur de la E-cadhérine (Peinado et al, 2004 ; Guo et Giancotti, 2004). Ainsi, il y aura une perte d'adhésion entre les cellules, premier pré-requis pour l'invasion tumorale (Pötter et al, 1999).

Les cellules tumorales peuvent ensuite exprimer des marqueurs de cellules mésenchymales tels que la vimentine, une molécule du cytosquelette (Zavadil et Böttinger, 2005). On remarque aussi un remodelage du cytosquelette d'actine. Les cellules vont alors commencer à migrer dans le tissu vers les vaisseaux sanguins. Il y aura d'abord formation de filipodes dans la direction de la migration. Puis, les filipodes fusionneront pour former des lamellipodes avec lesquels apparaîtront les foyers d'adhésion et les fibres de stress d'actine (Guo et Giancotti, 2004). C'est le début de l'invasion tumorale.

À ce niveau, les cellules peuvent utiliser deux principaux types de migration : la migration de type mésenchymal et la migration de type amoeboïde. Au début du processus d'invasion, les cellules utilisent souvent une migration mésenchymale qui nécessite la collaboration des intégrines et de la MT1-MMP (Wolf et al, 2003). Elles peuvent migrer de façon individuelle ou en groupe, mais le déplacement en groupe de cellules nécessite la présence minimale de cadhérines au niveau des jonctions intercellulaires (Hegerfeldt et al, 2002 ; Friedl, 2004). L'invasion mésenchymale requiert non seulement l'intervention des métalloprotéases, mais aussi celle de la calpaïne 2 pour le remodelage de la matrice extracellulaire (Carragher et al, 2006). Ce sont principalement les fibres de collagène qui seront dégradées pour céder le passage aux cellules tumorales (Wolf et al, 2003).

Lorsque les cellules perdent l'expression des intégrines à la surface cellulaire ou qu'il y a présence de plusieurs inhibiteurs de protéases, elles peuvent passer à une migration de type amoeboïde (Wolf et al, 2003 ; Sahai et Marshall, 2003 ; Friedl, 2004 ; Carragher et al, 2006). Ce type de migration nécessite l'induction de la voie de signalisation de RhoA/ROCK (Sahai et Marshall, 2003 ; Cardone et al, 2005 ; Wyckoff, 2006). Cette signalisation mène à la migration cellulaire par deux voies. Premièrement, RhoA peut activer Limk-2 qui inhibe la cofiline-1. Ceci permet la désorganisation des filaments d'actine dans la cellule (Moustakas et Heldin, 2005). Deuxièmement, il peut se former un module de signalisation dans les pseudopodes. Ce module est formé par RhoA, ROCK, p38 et NHE1. Cette voie d'invasion est rencontrée dans le cancer du sein. Lorsque les cellules sont privées de sérum, la kinase PKA s'active et phosphoryle la kinase RhoA qui est alors inactivée. Il y a donc inactivation de ROCK et ensuite de p38, un répresseur de NHE1. Ceci permet donc l'activation de NHE1 et la formation subséquente d'un pseudopode qui induit la migration des cellules (Cardone et al, 2005).

Dans la migration amoeboïde, les cellules exercent une pression sur les fibres de collagène de la matrice pour induire une déformation de celles-ci (Wyckoff, et al, 2006 ; Fukui, 2002). Il peut y avoir formation d'eupodes, des structures d'adhésion riches en actine, en myosine IB, en α -actinine et en coronine (Fukui et al, 1997), au niveau des pseudopodes et des lamellipodes pour faciliter l'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire (Fukui et al, 1999 ; Fukui, 2002). Les eupodes sont responsables de l'adhésion des cellules à leur substrat (Fukui, 2002). Le mécanisme d'action des eupodes n'est pas connu, mais ceux-ci semblent simplement s'insérer dans le substrat tel un pied

pointé en faisant interagir leurs structures d'actine avec celles des lamellipodes et les différentes protéines structurales présentes telles que l' α -actinine et la myosine (Fukui et Inoué, 1997 ; Fukui, 2002). Pendant tout le processus de migration, les cellules expriment des glycanes de sialyl qui permettent leur dissociation de la tumeur primaire (Fuster et Esko, 2005).

La migration des cellules les mène éventuellement à un vaisseau sanguin. Pour poursuivre leur progression, les cellules doivent procéder à l'intravasation (Guo et Giancotti, 2004). Il s'agit encore d'un processus d'invasion, mais cette fois-ci, on observe une migration mésenchymale puisque la membrane basale des vaisseaux sanguins doit être dégradée pour que les cellules entrent dans la circulation (Wolf et al, 2003 ; Guo et Giancotti, 2004 ; Carragher et al, 2006). À cette étape, les cellules tumorales interagissent avec la matrice par des intégrines et des IgCAMs à leur surface membranaire (Christofori, 2003).

Une fois entrées dans un vaisseau sanguin, les cellules tumorales peuvent interagir avec les plaquettes. Les cellules tumorales expriment en général des Sialyl de Lewis de deux types : Sialyl Le^x et Sialyl Le^a. Ces sucres particuliers sont reconnus par la E-sélectine et la P-sélectine qui se retrouvent à la surface des plaquettes (Fuster et Esko, 2005). C'est donc l'interaction entre ces sucres uniques des cellules tumorales et les sélectines qui permet la migration des cellules tumorales à l'intérieur des vaisseaux sanguins (Kannagi et al, 2004 ; Fuster et Esko, 2005). Elles migrent sous la forme d'agrégats constitués de cellules tumorales, de leucocytes et de plaquettes (Guo et Giancotti, 2004).

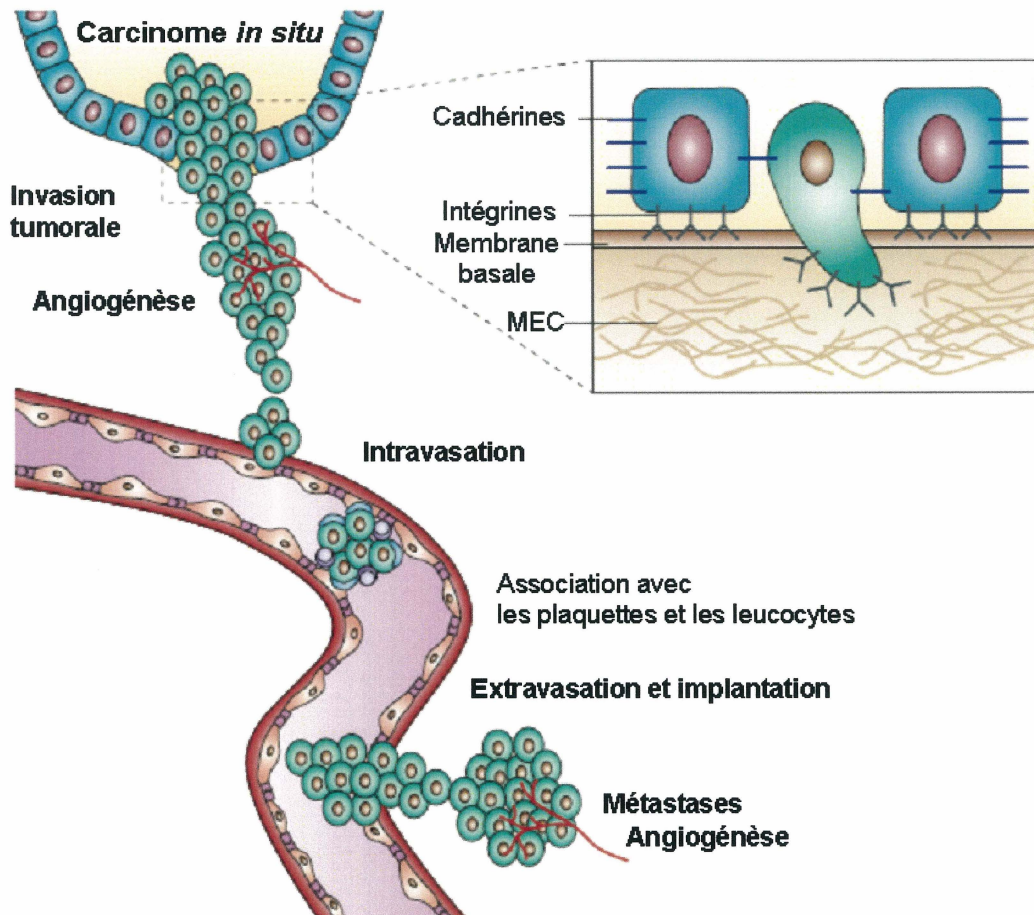
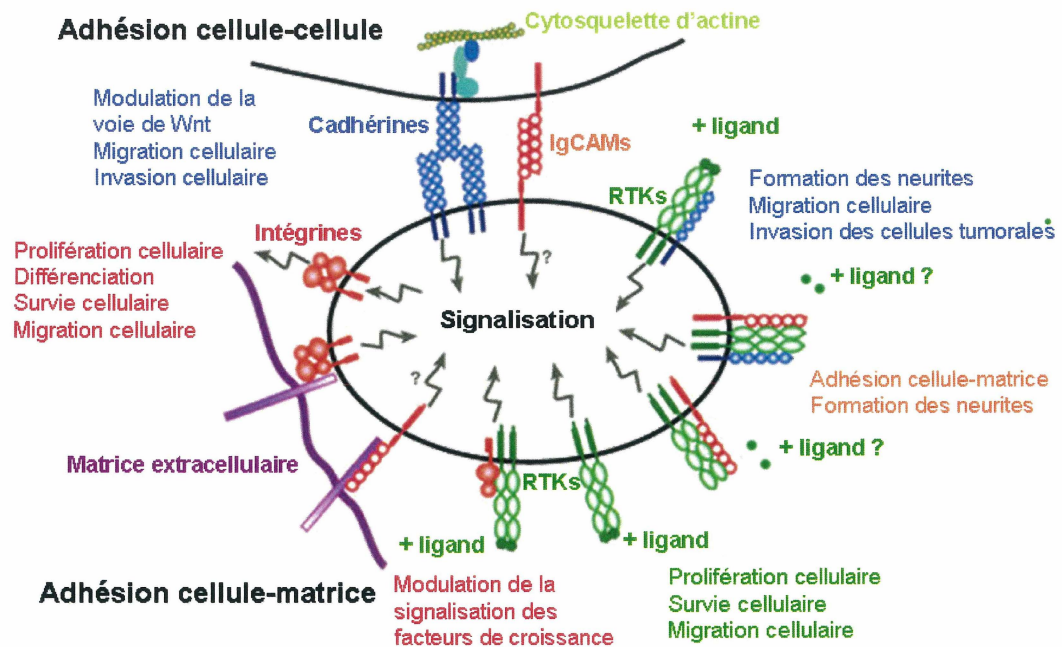


Figure 10 : Progression tumorale.

Adaptée de Guo, W. et F. G. Giancotti, 2004

La progression tumorale se divise en plusieurs étapes. Il y a d'abord prolifération d'une cellule ayant un avantage de prolifération et de survie. Ensuite, il y a invasion tumorale, intravasation et association des cellules tumorales avec les plaquettes et les leucocytes circulant, extravasation et métastases. On retrouve de l'angiogenèse au cœur de la tumeur et dans les métastases.



Adaptée de Christofori, G., 2003

Figure 11 : Implication des molécules d'adhésion dans la progression tumorale. Les intégrines, les cadhérines, les IgCAMs et les sélectines sont des éléments importants dans la prolifération, l'invasion, la motilité et la survie des cellules tumorales et ce, tout au long de la progression tumorale.

C'est ensuite le processus d'extravasation. À cette étape, les cellules tumorales produisent normalement des Sialyls de Lewis incomplets (Sialyl Le^{a/x}). Ce sucre est reconnu par la E-sélectine présente à la surface des cellules endothéliales activées (Kannagi et al, 2004). L'interaction entre le Sialyl de Lewis incomplet et la E-sélectine permet l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium vasculaire. Cette adhésion peut être renforcée par la présence de IgCAMs à la surface des cellules tumorales (Christofori, 2003). À la suite de cette adhésion ferme, les cellules recommencent à migrer. Il y a alors extravasation et invasion d'un nouveau tissu par une migration de type amoeboïde et formation d'une métastase (Deryugina et Quigley, 2006).

Une métastase est en fait une tumeur secondaire. Elle est formée par les cellules invasives de la tumeur primaire qui ont atteint un nouveau site où elles continuent de proliférer (Couzin, 2003). On y retrouve donc le même type d'interactions intercellulaires et d'interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire que dans la tumeur (Guo et Giancotti, 2004).

Les cellules se trouvant au centre de la tumeur solide et dans les métastases risquent de manquer d'oxygène et de nutriments. La condition hypoxique de ces cellules induit le processus d'angiogénèse par le facteur HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor*) (Carmeliet et al, 1998 ; Ryan et al, 1998 ; Richard et al, 1999). L'angiogénèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Il existe deux types d'angiogénèse. Le premier type est dépendant de l'hypoxie. Dans un environnement où la concentration en oxygène est très faible, le facteur HIF-1, constitué des sous-unités α et β , est stabilisé. Ce facteur de

transcription peut induire l'expression de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), un facteur important dans le développement des vaisseaux sanguins (Ryan et al, 1998 ; Frantz et al, 2005). Il y a alors formation de nouveaux vaisseaux pour irriguer les cellules tumorales et métastatiques. Le deuxième type d'angiogénèse est appelé angiogénèse native. Ce type d'angiogénèse est moins connu. Le processus implique encore le VEGF, mais est indépendant de l'hypoxie. Certaines tumeurs sécrètent un niveau basal de VEGF sans l'aide du facteur de transcription HIF-1. Ces tumeurs peuvent induire l'angiogénèse en absence d'hypoxie (Cao et al, 2005b).

Le processus de progression tumorale est résumé à la figure 10.

Les interactions intercellulaires et entre les cellules tumorales et leur environnement sont essentielles pour qu'il y ait progression tumorale. Les intégrines, les IgCAMs, les cadhérines et les sélectines sont des éléments clés du processus (Christofori, 2003). Les implications de ces molécules d'adhésion sont représentées à la figure 11.

1.3 Le cancer et la furine

La furine est impliquée dans le processus de tumorigénèse à différents niveaux. Elle peut augmenter le caractère invasif des tumeurs, favoriser la croissance tumorale et stimuler l'angiogénèse. Elle exerce ces fonctions en mûrissant divers acteurs impliqués dans la tumorigénèse tels que l'IGF-1R impliqué dans la prolifération des cellules et donc la croissance tumorale, la MT1-MMP impliquée dans l'invasion cellulaire par le remodelage de la matrice extracellulaire et donc dans l'incidence des métastases et le

VEGF-C impliqué dans la croissance des vaisseaux lymphatiques et donc dans la lymphangiogenèse des cellules tumorales (Bassi et al, 2000 ; Bassi et al, 2005).

La furine permet l'activation de la MT1-MMP qui est impliquée dans l'activation de plusieurs métalloprotéases telles que la MMP-2 et la MMP-9. Ces métalloprotéases dégradent certains constituants de la matrice extracellulaire pour permettre la migration des cellules (Bassi et al, 2003 ; McMahon et al, 2003). Il s'agit d'une migration mésenchymale, type de migration utilisé par les cellules tumorales pour atteindre la circulation sanguine et entrer dans les vaisseaux sanguins (Wolf et al, 2003). Dans ce contexte, la furine peut augmenter l'agressivité des tumeurs.

La MT1-MMP est aussi impliquée dans la maturation des intégrines de la famille α_v à titre de convertase d'intégrine. Elle clive les intégrines à deux endroits et ce, en compétition avec la furine. Les intégrines α_v maturées par la MT1-MMP induisent l'adhésion et la migration des cellules sur la vitronectine de la matrice extracellulaire, ce qui permet une plus forte incidence des métastases (Ratnikov et al, 2002 ; Deryugina et al, 2002). Dans ce contexte, la furine a des fonctions opposées selon sa concentration. À de faibles concentrations, elle mature la MT1-MMP et favorise ainsi le développement de métastases par la maturation subséquente des intégrines α_v par la MT1-MMP. Par contre, en plus forte concentration, les intégrines α_v seront préférentiellement maturées par la furine ce qui aura pour effet d'inhiber le caractère invasif des cellules tumorales (Ratnikov et al, 2002 ; Deryugina et al, 2002).

La furine est co-exprimée avec le VEGF, un facteur de croissance des vaisseaux sanguins, dans les cellules cancéreuses dont les cellules de carcinome squameux de la langue (López de Cicco et al, 2004). Il a été démontré que la furine, tout comme la PC5 et la PC7, peut maturer le VEGF-C. Cette maturation du VEGF permet d'induire la lymphangiogénèse au cœur des tumeurs primaires et des métastases (Seigfried et al, 2003). La furine peut également maturer le PDGF-A, un facteur de croissance impliqué dans la formation des vaisseaux sanguins. À la suite de sa maturation par la furine, le PDGF-A induit la prolifération des cellules en leur permettant de passer de la phase G1 du cycle cellulaire à la phase S (Seigfried et al, 2003).

L'autotaxine ou NPP2 (*Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2*), une lysophospholipase D extracellulaire impliquée dans la tumorigénèse, est aussi activée par la furine. L'autotaxine induit la prolifération cellulaire par la voie de Ras, la survie cellulaire par l'activation de la protéine kinase B et l'invasion cellulaire par les voies de RhoA et Rac. Toutes ces fonctions sont en fait remplies par l'acide lysophosphatidique (LPA) issu de l'hydrolyse de la lysophosphatidylcholine par l'autotaxine (Jansen et al, 2005).

La furine est aussi impliquée dans la formation des métastases osseuses. Elle agit au niveau de la maturation de certaines sémaphorines de classe 3. La plupart des sémaphorines ne sont pas impliquées dans le processus métastatique. En fait, Sema3A et Sema3F inhibent l'angiogénèse. Par contre, Sema3E, qui est activée par la furine, induit l'invasion cellulaire et la formation de neurites. On la retrouve spécifiquement associée à la formation des métastases osseuses (Christensen et al, 2005).

La furine est fortement impliquée dans la formation des métastases et confère un caractère agressif aux tumeurs. Elle constitue donc une cible thérapeutique intéressante. En effet, l'inhibition de la furine est associée à une diminution de l'agressivité des tumeurs et une inhibition du caractère invasif (Bassi et al, 2001 ; Mercapide et al, 2002 ; López de Cicco et al, 2005).

La furine a comme autre substrat le TGF β qui est impliqué dans la tumorigénèse à tous les niveaux.

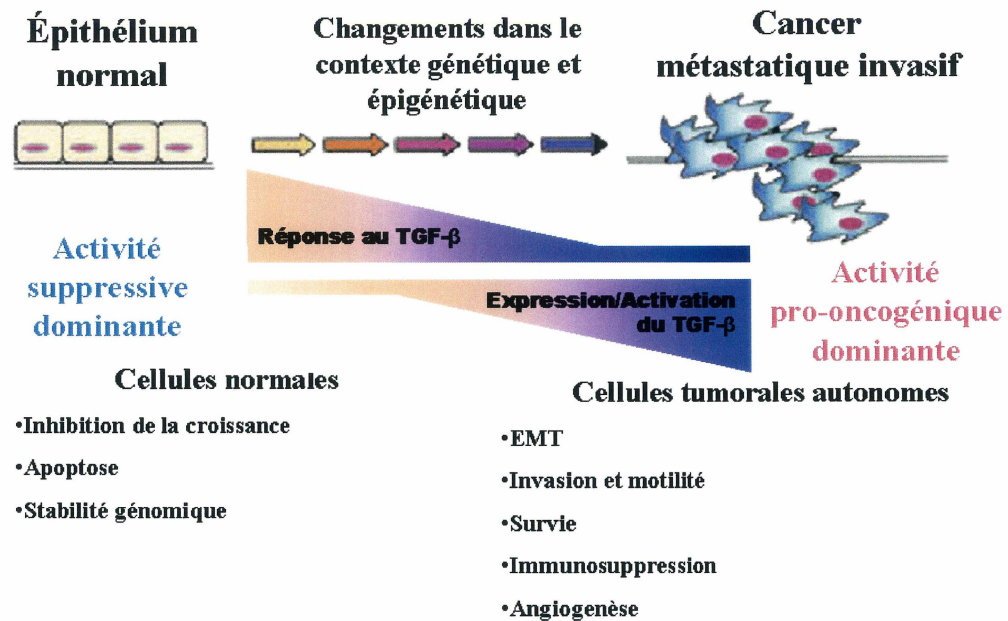
1.4 Le TGF β et le cancer

Le TGF β est impliqué dans plusieurs néoplasies dont le cancer du cerveau, des poumons, du sein, de l'estomac, de l'œsophage, du foie, du pancréas, de la peau, les lymphomes et les cancers génito-urinaires. Dans tous ces cancers, on retrouve des mutations dans la voie du TGF β soit au niveau des récepteurs, des Smads ou du TGF β lui-même. Ces mutations sont souvent associées à un mauvais pronostic (Pasche, 2001).

Le rôle du TGF β dans le cancer change en fonction du stade atteint. Au début du développement d'un cancer, le TGF β a un effet protecteur. Il peut inhiber la prolifération (Ten Dijke et al, 2002 ; Wilkes et al, 2005 ; Khalil et al, 2005 ; Huang et Huang, 2005) des cellules tumorales, induire l'apoptose (Dijke et al, 2002 ; Moustakas et Heldin, 2005) et assurer une stabilité génomique (Roberts et Wakefield, 2003).

Par contre, dans les stades plus avancés de la carcinogénèse, le TGF β promeut plutôt la progression tumorale et la formation de tumeurs. En effet, le TGF β peut induire la dédifférenciation des cellules tumorales (Gotzmann et al, 2002 ; Huber et al, 2005 ; Zavadil et Böttinger, 2005 ; Medici et al, 2006), augmenter l'invasion et la motilité (Yu et Stamenkovic, 2000 ; Dumont et al, 2003 ; Xu et al, 2006 ; Leivonen et al, 2006) de ces mêmes cellules et promouvoir la survie cellulaire (Roberts et Wakefield, 2003). Il peut également stimuler l'angiogénèse (Yu et Stamenkovic, 2000 ; Lu et al, 2004) dans l'environnement tumoral et induire l'immunosuppression (Zhang et al, 2006). Ces rôles opposés du TGF β sont observés dans plusieurs développements tumoraux dont le cancer du sein (Tang et al, 2003 ; Muraoka-Cook et al, 2005). La figure 12 illustre les rôles opposés du TGF β dans la tumorigénèse.

Le TGF β peut inhiber l'expression de la E-cadhérine au niveau des jonctions entre les cellules et induire ainsi la dédifférenciation des cellules (Gotzmann et al, 2002 ; Gotzmann et al, 2006). Le TGF β semble agir en collaboration avec la voie du PDGF à ce niveau, du moins chez les hépatocytes (Gotzmann et al, 2006). En effet, à la suite d'une stimulation par le TGF β , on remarque une surexpression de certaines protéines dans la voie du PDGF dont PDGF-A et PDGFR- α (Gotzmann et al, 2006).



Adaptée de Roberts, A. B. et L. M. Wakefield, 2003

Figure 12 : Rôles du TGF β dans la tumorigénèse. Le TGF β peut inhiber la progression tumorale en inhibant la croissance cellulaire, en favorisant l'apoptose et en assurant la stabilité génomique. Par contre, il peut favoriser la progression tumorale en développant l'immunosuppression, en induisant l'angiogenèse, l'invasion et la motilité cellulaire, en favorisant la survie cellulaire et en initiant la dédifférenciation des cellules. De plus, on constate que la réponse au TGF β diminue au cours de la progression tumorale alors que son expression et son activation augmentent.

À la suite de la perte de leurs jonctions cellulaires, les cellules se dédifférencient jusqu'à un type mésenchymal. Le TGF β est encore impliqué dans les étapes subséquentes de transition d'un type cellulaire épithélial à un type mésenchymal. Il peut induire l'expression de Snail, un inhibiteur de la E-cadhérine, et inhiber l'expression de la GSK3 β permettant ainsi l'expression de la β -caténine et ensuite de LEF-1. Le complexe Snail :LEF-1 est important dans le processus de dédifférenciation cellulaire (Medici et al, 2006).

Une fois dédifférenciées, les cellules acquièrent un avantage de prolifération, de motilité et d'invasion. Le TGF β peut induire la prolifération des cellules par la signalisation initiée par le complexe des récepteurs T β R-I :T β R-II (Huang et Huang, 2005). Plus précisément, le TGF β induit la prolifération cellulaire, entre autres des cellules fibroblastoïdes, par la voie de p38 et de JNK (Khalil et al, 2005). De plus, dans certains cancers, les cellules acquièrent un avantage de prolifération par la perte de la réponse au TGF β . Cette perte de réponse peut être imputable à des mutations comme c'est le cas dans certains cancers du colon où le T β R-II est muté. Dans ce cas, le TGF β ne peut pas inhiber la prolifération par la modulation de c-Myc ou l'expression de régulateurs du cycle cellulaire dont p21 et p15 (Grady et al, 2006).

Le TGF β peut aussi stimuler la motilité cellulaire. Dans des cellules de cancer du sein, lorsque l'on exprime un récepteur de type II non fonctionnel, la motilité est

significativement réduite. Toutefois, cette fonction du TGF β semble indépendante de la voie des Smads et le mécanisme exact n'est pas encore connu (Dumont et al, 2003).

Pour ce qui est de l'invasion tumorale, le TGF β peut faciliter la migration de type mésenchymal de plusieurs façons. D'abord, il peut augmenter l'expression de certaines métalloprotéases dont la MMP-13 par la voie des Smads (Leivonen et al, 2006) et la MMP-2 par la voie de p38 (Xu et al, 2006). Ces métalloprotéases sont impliquées dans la dégradation du collagène présent dans la matrice extracellulaire, ce qui facilite l'invasion des cellules tumorales vers la circulation sanguine. Il est à noter que dans certains cas, le TGF β peut inhiber l'invasion tumorale par l'induction d'un inhibiteur des métalloprotéases, soit TIMP-1 (Kwak et al, 2006). C'est le cas des cellules de fibrosarcome humain HT1080.

Tel que déjà mentionné dans les sections précédentes, le TGF β est également un inducteur de l'angiogénèse par la balance entre les récepteurs ALK-1 et ALK-5. D'ailleurs, à la suite d'une stimulation constitutive par le TGF β chez des souris, une colocalisation du récepteur ALK-1, du marqueur de vaisseaux sanguins CD31 et des R-Smads 1, 5 et 8 phosphorylés est observée (Lu et al, 2004). En effet, lors de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, le récepteur ALK-1 induit la prolifération des cellules endothéliales et la production de TGF β par ces mêmes cellules par l'activation des R-Smads 1, 5 et 8 alors que le récepteur ALK-5 favorise la différenciation des cellules endothéliales et des péricytes en activant les R-Smads 2 et 3 (Armulik et al, 2005).

Le TGF β est fortement associé au développement des métastases. Par exemple, une forte expression de TGF β dans les tumeurs mammaires est associée à un important développement de métastases (Muraoka-Cook et al, 2004). Toujours dans le cancer du sein, le TGF β produit par les os peut induire la production de COX-2 (*Cyclooxygénase-2*) dans les cellules tumorales et ainsi favoriser le développement de métastases osseuses (Hiraga et al, 2006).

Le TGF β étant aussi fortement impliqué dans le développement tumoral, il constitue une cible thérapeutique intéressante. Deux voies de traitements ont particulièrement été étudiées, soit l'inhibition du TGF β par des ARNs d'interférence et l'inhibition des récepteurs du TGF β . L'utilisation d'ARN d'interférence pour bloquer les effets du TGF β a été testée dans des modèles de gliomes chez le rat et la souris. Dans les deux cas, l'inhibition du TGF β a permis de réduire la croissance et l'invasion tumorale, voire d'éradiquer les tumeurs (Fakhrai et al, 1996 ; Friese et al, 2004). Par contre, chez les cellules de glioblastome U-87, le TGF β semble inhiber la croissance tumorale de façon autocrine. Il aurait donc un effet protecteur contre le développement du cancer (Pan et al, 2005).

Le blocage de la voie du TGF β par des récepteurs mutés dominants négatifs ou des inhibiteurs du T β R-1, tel le SD-208, a aussi été testé dans une optique thérapeutique. Dans les deux cas, une diminution de l'invasion et des métastases a été observée. Cette méthode semble inhiber la croissance et l'invasion tumorale des cellules gliales humaines (Uhl et al, 2004). Elle permet aussi de réduire la formation de métastases osseuses et

pulmonaires chez des modèles de souris (Bandyopadhyay et al, 2006). Enfin, elle interfère dans le développement du cancer de la prostate indépendant de l'androgène (Zhang et al, 2005).

Bien que dans la majorité des cas les thérapies ciblant le TGF β semblent efficaces, elles sont à envisager avec prudence. Le TGF β est important dans l'homéostasie (Fleisch et al, 2006). De plus, dans les stades précoces du cancer, il agit en tant que suppresseur de tumeurs et des mutations dans la voie du TGF β sont souvent synonymes de mauvais pronostic, entre autres dans le cancer du côlon (Grady et al, 2006). Il faut aussi prendre en considération que les effets néfastes du TGF β apparaissent dans les stades tardifs du cancer où les cellules répondent moins bien à celui-ci (Roberts et Wakefield, 2003). Néanmoins, un bloqueur du TGF β inhiberait à la fois ses effets paracrines et ses effets autocrines. La résultante devrait donc être efficace, du moins en théorie, contre le développement des tumeurs (Arteaga, 2006).

1.5 Objectif et pertinence du projet de recherche

L'environnement tumoral constitue un foyer inflammatoire dans lequel on retrouve différents acteurs dont des cytokines, des chimiokines et de l'hypoxie. Tous ces acteurs sont impliqués dans la progression tumorale. D'abord, l'hypoxie induit la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 (Ryan et al, 1998 ; Frantz et al, 2005). Il a été démontré au laboratoire que ce facteur peut stimuler l'expression de la furine, une convertase de proprotéines impliquée dans la maturation de nombreuses protéines, dont des facteurs de

croissance, ayant une activité importante dans le cancer (McMahon et al, 2005). Elle est entre autre impliquée dans la maturation de la cytokine TGF β (Dubois et al, 1995 ; Dubois et al, 2001), de la métalloprotéase MT1-MMP (Sato et al, 1996) et des facteurs de croissance VEGF-C (Siegfried et al, 2003) et PDGF (Seigfried et al, 2003). L'action combinée de tous ces facteurs induit la progression tumorale en favorisant la prolifération, l'invasion, l'angiogénèse et la formation de métastases distantes (McMahon et al, 2005). La furine est donc un promoteur indirect de la progression tumorale.

Le TGF β est aussi impliqué dans plusieurs cancers. Selon le stade atteint par la tumeur, il peut avoir des effets protecteurs ou promoteurs (Pardali et Moustakas, 2006 ; Jakowlew, 2006). Il est connu que la furine est responsable de la maturation du TGF β , étape préliminaire à l'activation de celui-ci (Dubois et al, 1995 ; Dubois et al, 2001). On peut donc supposer que le TGF β est en partie responsable du rôle de la furine dans la tumorigénèse. Le but de ce projet de recherche est de déterminer le rôle de la maturation du TGF β par la furine dans la tumorigénèse. Plus précisément, il s'agit d'une part de vérifier si la maturation du TGF β par la furine lui confère un rôle protecteur ou promoteur sur la progression tumorale et d'autre part de vérifier si le TGF β est responsable des effets associés à la furine dans ce même processus.

Pour ce faire, des transfectants stables exprimant la forme sauvage du TGF β ou la forme mutée au site de clivage par la furine ont été utilisés. Des transfectants stables exprimant la forme sauvage ou la forme constitutivement active du récepteur T β R-I et/ou exprimant un inhibiteur de la furine, le PDX , ont également servi à l'étude. Afin de caractériser le

rôle de la furine dans la manifestation des effets du TGF β sur les cellules cancéreuses et la contribution du TGF β aux effets de la furine sur ces mêmes cellules, la capacité de prolifération, de dédifférenciation, d'adhésion, d'invasion et de motilité des divers transfectants stables a été comparée *in vitro*. Afin de confirmer les observations faites *in vitro*, un modèle de progression tumorale *in vivo* a été réalisé en injectant des *pools* de transfectants stables exprimant la forme sauvage du TGF β ou sa forme mutée au site de clivage par la furine chez des souris nu/nu. La croissance tumorale a été observée chez ces souris et l'induction de la voie des Smads a été caractérisée chez chaque tumeur.

2. Matériel et méthode

2.1 Culture de cellules

Les cellules de fibrosarcome humain HT1080 (ATCC, Rockville, Maryland, U.S.A.) ont été cultivées dans du milieu MEM (*Minimum Essential Medium*) (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (Hyclone, Logan, Utah, U.S.A.) et 40 µg/ml de gentamicine (Sandoz Canada, Québec, Canada). Les lignées transfectées de façon stable ont été maintenues dans le même milieu avec l'antibiotique de sélection généticien 418 (G-418) (Gibco BRL) à une concentration de 600 µg/ml.

Les cellules épithéliales HEK 293 (ATCC) et HepG2 (ATCC) ont été cultivées dans les mêmes conditions que les cellules HT1080. Les cellules NIH 3T3 (ATCC) ont pour leur part été cultivées dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco BRL) contenant également 10% de sérum fœtal de veau et 40 µg/ml de gentamicine. Toutes les lignées ont été conservées dans un incubateur dont la température était réglée à 37°C et le taux de CO₂ à 5%.

2.2 Transfections stables

Les cellules HT1080 ont été transfectées de façon stable avec les différents plasmides présentés au tableau V. Les cellules ont d'abord étéensemencées en raison de $5,0 \times 10^5$ cellules par boîte de pétri de 100 X 20 mm (Sarstedt, Montréal, Québec, Canada). Le

lendemain, elles ont été transfectées par précipitation au CaPO_4 à l'aide de la trousse *Mammalian Cell Transfection* (Chemicon International, Temecula, Californie, U.S.A.). La transfection a été réalisée selon les indications du fabricant. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ayant intégré le plasmide ont été sélectionnées par l'ajout de 1,2 mg/ml de G-418 dans le milieu. Les cellules ont été maintenues avec cette forte concentration d'antibiotique jusqu'à ce qu'il se forme suffisamment de colonies pour pouvoir les passer à 2 reprises. Ensuite, elles ont été maintenues dans du milieu contenant 600 $\mu\text{g/ml}$ d'antibiotique de sélection.

Tableau V : Transfectants stables représentés par le nom du plasmide correspondant

Transfectants stables	Impacts escomptés
pcDNA 3.1	Contrôle
CMV-TGF β de type sauvage	Surexpression du TGF β
CMV-TGF β ^{275AHRA278}	Inhibition de l'effet du TGF β suite à une réduction de sa maturation
T β RI ^{T204D}	Induction de la signalisation de façon indépendante au ligand TGF β (récepteur constitutivement actif)
T β RI de type sauvage	Surexpression du T β RI
CMV-PDX	Inhibition de la maturation des substrats de la furine
CMV-PDX/CMV-TGF β de type sauvage	Inhibition de la maturation du TGF β par la furine
CMV-PDX/T β RI ^{T204D}	Reconstitution de l'activité du TGF β

2.3 Construction des vecteurs d'expression

Les gènes T β RI de type sauvage et T β RI constitutivement actif ont été clonés dans le vecteur pcDNA 3.1 avant d'être utilisés. Les deux gènes étaient contenus dans le vecteur pCMV5 avec lequel il a été impossible de former des *pools* de transfectants stables. En

effet, le taux de mortalité était de 100% après quelques jours de traitement avec l'antibiotique de sélection. Les plasmides d'origine et le vecteur pcDNA3.1 ont donc été digérés avec les enzymes de restriction EcoRI (New England Biolabs, Pickering, Ontario, Canada) et BamHI (New England Biolabs). Le produit de ces digestions a été migré sur un gel d'agarose 1% (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada) contenant 0,33 µg/ml de bromure d'éthidium (Sigma, Springfield, U.S.A.) et les bandes correspondant aux gènes d'intérêt et au vecteur linéarisé ont été extraites à l'aide de la trousse *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). Une ligation de 1 heure à la température ambiante par la ligase T4 (New England Biolabs) a permis de liguer les constructions. Les plasmides ainsi obtenus ont été vérifiés par une digestion avec l'enzyme de restriction SmaI (New England Biolabs) et par séquençage après leur amplification.

Le gène PDX, possédant un promoteur CMV, a été cloné dans le vecteur pcDNA3.1/Hygro fourni par le laboratoire du Dr Day. Le gène PDX et son promoteur CMV ont été excisés du vecteur pcDNA3.1 par une digestion avec les enzymes de restriction NheI (New England Biolabs) et AflII (New England Biolabs). Le vecteur pcDNA3.1/Hygro a été digéré avec ces mêmes enzymes. Le résultat des digestions a été migré sur un gel d'agarose 1% contenant 0,33 µg/ml de bromure d'éthidium (Sigma). Les bandes correspondant au gène et au vecteur vide linéarisé ont été extraites à l'aide de la trousse *QIAquick Gel Extraction*. Le gène a ensuite été ligué dans le vecteur à l'aide de la ligase T4 pendant une heure à la température ambiante. La construction a été vérifiée par une digestion avec l'enzyme de restriction SalI (New England Biolabs) après

son amplification. Ce vecteur, contenant le gène de résistance à l'hygromycine, a été utilisé pour créer des lignées de transfectants stables doubles, soit exprimant à la fois le CMV-PDX et le CMV-TGF β ou le T β R-1^{T204D} possédant plutôt le gène de résistance au généticien.

Le mutant CMV-TGF β ^{275AHRA278} a été créé à l'aide de la trousse *PhusionTM High-Fidelity PCR* (New England Biolab) selon les indications du fabricant. Quatre oligonucléotides ont été utilisés (la séquence portant la mutation a été soulignée) :

1. TGF-F : 5'-cgatacctcagcaacc-3' (Oligonucléotide sens du TGF β)
2. TGF-R : 5'-gttatccctgctgtcac-3' (Oligonucléotide anti-sens du TGF β)
3. TGFMUT-F : 5'-cccagcatctgcaaagctccgcccaccgcgccgccttgacacaaactattg-3'
(Oligonucléotide sens portant la mutation)
4. TGFMUT-R : 5'-caatagttggtgtccagggcggcgcggtggcgggagctttgcagatgctggg-3'
(Oligonucléotide anti-sens portant la mutation)

En fait, trois réactions de PCR ont été réalisées. La première réaction a permis d'amplifier la portion 5' du gène de l'extrémité jusqu'à la mutation. Pour ce faire, les oligonucléotides TGF-F et TGFMUT-R ont été utilisés. Par la suite, la seconde réaction a permis d'amplifier la deuxième partie du gène, soit la portion comprise entre la mutation et l'extrémité 3'. Cette fois, ce sont les oligonucléotides TGFMUT-F et TGF-R qui ont été utilisés. Les résultats de ces deux réactions de PCR ont été migrés sur un gel d'agarose 1% contenant 0,33 μ g/ml de bromure d'éthidium. Les bandes correspondant à

chacune des portions du gène d'intérêt ont été extraites à l'aide de la trousse *QIAquick Gel Extraction*. L'ADN ainsi extraite a été utilisée dans une autre réaction de PCR. Cette dernière réaction de PCR a permis à la fois de liguer les deux portions partielles du gène et d'amplifier ce dernier. Ce sont les oligonucléotides TGF-F et TGF-R qui ont été utilisés pour y parvenir. Le résultat de cette dernière réaction de PCR a été migré sur un gel d'agarose 1% contenant 0,33 µg/ml de bromure d'éthidium. La bande correspondant au CMV-TGFβ^{275AHRA278} été extraite à l'aide de la trousse *QIAquick Gel Extraction* et l'ADN ainsi obtenu a été digéré avec les enzymes de restrictions XhoI et AflIII (New England Biolab)

Le produit de la digestion a été ligué dans le vecteur pcDNA3.1 linéarisé contenant un promoteur CMV à l'aide de la ligase T4 pendant 15 minutes à la température de la pièce, puis 16 heures à 4°C. Suite à son amplification, la construction a été vérifiée par digestion avec l'enzyme de restriction XhoI et par séquençage.

2.4 Immunobuvardage de type Western

2.4.1 Préparation des cellules

Afin de vérifier l'expression des transgènes dans les cellules et la fonctionnalité de la voie des Smads, des buvardages de type Western pour ces transgènes et la forme phosphorylée de Smad2 ont été réalisés. L'expression de l'actine et de Smad2 a été vérifiée de la même façon à titre de contrôle. Pour ce faire, les cellules ont été

ensemencées 48 heures avant l'essai à raison de $5,0 \times 10^5$ cellules par boîte de pétri de 100 X 20 mm. Seize heures avant l'essai, les cellules ont été sevrées par un lavage au PBS et l'ajout de milieu sans sérum.

2.4.2 Préparation des surnageants

Le milieu de chaque boîte de pétri a été récupéré et centrifugé à 2000 rpm afin de retirer tous les débris et cellules mortes. Les surnageants ainsi obtenus ont ensuite été dialysés et lyophilisés.

La dialyse a été réalisée dans des membranes à dialyse pour des protéines de 6 000 à 8 000 Da (Spectrum Laboratories, Californie, U.S.A.). Les membranes ont été bouillies dans une solution de bicarbonate de sodium (Fisher Scientific, New Jersey, U.S.A.) à 2 % contenant 1 mM d'EDTA pendant 10 minutes puis dans une deuxième solution ne contenant que 1 mM d'EDTA pendant encore 10 minutes. Les membranes contenant les surnageants ont été déposées dans une solution d'acide acétique glacial (Fisher Scientific) à 0,2 M pendant 20 heures avec agitation à 4°C.

Les surnageants dialysés ont été transférés dans des tubes, congelés 30 minutes à -20°C, puis 1 heure à -80°C. Ils ont ensuite été lyophilisés dans un lyophilisateur *Freezone 6* (Labconco, Kansas, Missouri, U.S.A.) pendant 24 heures. Les culots obtenus ont été resuspendus dans 18 µl de tampon concentrateur (0,5 M de Tris-Base et 0,4% de SDS, pH 6,8) avant d'être dosés.

2.4.3 Préparation des lysats protéiques

Une fois les surnageants récupérés, les cellules ont été lavées 2 fois avec une solution saline froide tamponnée au phosphate (PBS). Les cellules ont été récupérées dans 35 µl de tampon de lyse Ripa (0,15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 5 mM EDTA, 0,5% déoxycholate de sodium) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (*Mini Complete Protease Inhibitors Cocktail*) (Roche Diagnostique, Laval, Québec, Canada) à l'aide de grattoirs en plastique. Les échantillons protéiques ainsi obtenus ont été agités sur un appareil rotatoire à 4°C pendant 30 minutes puis centrifugés à 13 000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. Les surnageants obtenus, contenant les protéines, ont été conservés et dosés.

2.4.4 Dosage des protéines

Les protéines des lysats et des surnageants ont été dosées à l'aide de la trousse de dosage à l'acide bicinchoninique *BCA Protein Assay* (Pierce, Rockford, U.S.A.) selon les indications du manufacturier. L'acquisition des données a été faite à l'aide du programme *Soft_{max} Pro* fourni avec le lecteur de plaque.

2.4.5 Buvarpage de type Western

Une fois dosé, 150 µg de protéines pour chaque échantillon a été pris pour l'essai. Les échantillons de surnageants ont été mélangés avec le tampon de chargement 2X (1,25 M

Tris-HCl, 4,1% SDS, 20% glycérol, 10% à-mercaptoéthanol, pH 6,8) dans un rapport 1 :1 alors que les échantillons de lysats l'ont été avec le tampon de chargement 6X (3,75 M Tris-HCl, 12,3% SDS, 60% glycérol, 30% à-mercaptoéthanol) dans un rapport 5 :1. Ensuite, les échantillons ont été bouillis pendant 5 minutes, puis ont été déposés sur glace pendant 2 minutes afin d'être refroidis avant d'être chargés sur le gel. Le gel concentrateur d'un pH de 6,8 avait une concentration de 4% d'acrylamide (Roche Diagnostique), de 0,1% de SDS (*Sodium Lauryl Sulfate*) (Fisher Scientific) et de 125 mM de Tris-HCl (Sigma). Le gel séparateur à un pH de 8,8 avait une concentration de 7,5% d'acrylamide, de 0,1% de SDS et de 375 mM de Tris-HCl. La migration s'été déroulée à 140 V pendant environ 1 heure sur un appareil électrophorèse (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) dans un tampon de migration (0,1% SDS, 25 mM Tris-Base, 50 mM glycine).    la suite de la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF (Roche Diagnostique). Le transfert s'été déroulé à 110 V pendant 90 minutes dans un tampon de transfert froid (25 mM Tris-Base, 200 mM glycine, 20% méthanol). Suite au transfert, les membranes ont été bloquées dans une solution *Blotto* (5% de lait en poudre Carnation et 0,1% Tween-20 dans du PBS)    la température ambiante pendant 1 heure avec agitation. Les membranes ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire de type IgG pendant 16 heures à 4  C avec agitation. Les anticorps dirigés contre le TGF  , Smad2, l'étiquette HA ou 6-His et l'actine ont été dilués dans la solution *Blotto* dans un rapport 1 :1000 alors que l'anticorps contre le Smad2 phosphorylé a été dilué dans le même rapport, mais dans une solution de PBS contenant 5% de BSA et 0,1% de Tween-20 (Bio-Rad). Afin de retirer l'excédant d'anticorps, les membranes ont été lavées 3 fois pendant 10 minutes avec agitation à la température ambiante dans une

solution de PBS contenant 0,06% de Tween-20. Elles ont ensuite été incubées 1 heure avec agitation à la température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué dans la solution Blotto. Les rapports de dilution des anticorps secondaires se retrouvent au tableau VI. Les membranes ont encore été lavées 3 fois pendant 10 minutes à la température ambiante dans une solution de PBS contenant 0,06% de Tween-20. Ensuite, la révélation a été faite à l'aide de la trousse de détection *ECL* (Amersham Biosciences, Oakville, Ontario, Canada) selon les indications du manufacturier. Afin de visualiser les bandes, les membranes ont été placées dans des cassettes d'exposition avec des films de type *Hyperfilm ECL* (Amersham Biosciences) qui ont pu être développés sur un appareil de type *RP X-Omat Processor*.

Tableau VI : Anticorps primaires et leur anticorps secondaire correspondant

Anticorps primaire	Anticorps secondaire	Dilution de l'anticorps secondaire
α -LAP (TGF β) (R&D Systems, Minnesota, U.S.A.)	IgG de chèvre (Amersham Biosciences)	1 :8000
α -HA (Boehringer Mannheim, Indianapolis, U.S.A.)	IgG de souris (Amersham Biosciences)	1 :2500
α -Phospho-Smad2 (Cell Signaling technology, Boston, Massachusetts, U.S.A.)	IgG de lapin (Amersham Biosciences)	1 :5000
α -Smad2 (Cell Signaling Technology)	IgG de souris (Amersham Biosciences)	1 : 2500
α -6His (Roche Diagnostic)	IgG de souris (Amersham Biosciences)	1 :2500
α -Actine (Sigma)	IgG de lapin	1 :5000

2.5 PCR quantitatif en temps réel

2.5.1 Extraction de l'ARN messenger

Les cellules ont étéensemencées 48 heures avant l'extraction de l'ARN messenger (ARNm) à une confluence de $6,0 \times 10^5$ cellules par boîte de pétri de 100 X 20 mm. Seize heures avant l'extraction, les cellules ont été sevrées et, lorsqu'indiqué, stimulées avec 2 ng/ml de TGF β . Les cellules ont été lavées une seule fois avec une solution de PBS stérile avant que l'ARNm soit extrait à l'aide du réactif *TRIzol* (Invitrogen, Oregon, U.S.A.) selon les indications du manufacturier. À la suite de l'extraction, l'ARNm a été dosé à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre afin d'en déterminer la concentration.

2.5.2 Transcription inverse

Pour procéder au PCR, l'ARNm a été transformé en ADN complémentaire par transcription inverse. Une quantité de 1 μ g d'ARNm a été mélangée à 500 μ M de dNTP (Amersham Biosciences) et 1 pM de décamères aléatoires (Ambion, Austin, Texas, U.S.A.) dans un volume final de 16 μ l avant d'être incubée à 80°C pendant 3 minutes dans un appareil à PCR de type *Whatman Biometra T-Gradient* (Montréal Biotech, Kirkland, Québec, Canada) afin de la dénaturer. Ensuite, 200 U de la transcriptase inverse M-MLV (Promega, Wisconsin, U.S.A.) et 4 μ l de son tampon (Promega) ont été ajouté au mélange réactionnel pour un volume final d'environ 20 μ l. Le mélange obtenu a été incubé 1 heure à 42°C dans un appareil à PCR de type *Whatman Biometra T-Gradient*.

2.5.3 Clonage des gènes

Pour le PCR quantitatif, 2 courbes standard ont été utilisées, soit une pour le gène d'intérêt et une pour le gène contrôle, soit le RPL-P0 (*Ribosomal Protein LP0*). Ces gènes ont été clonés dans le vecteur pGEM-T (Promega). Pour ce faire, un PCR a été réalisé pour chaque gène. Les oligonucléotides utilisés ainsi que les températures d'appariement de chaque gène sont présentés au tableau VII. Un mélange réactionnel constitué de 1 µl d'ADN complémentaire, 1 µM de chaque oligonucléotide (Gibco BRL), 200 µM de dNTP (Roche Diagnostique), 1,0 U de Taq polymérase (Roche Diagnostique) et du tampon de PCR contenant du magnésium (Roche Diagnostique) pour un volume total de 50 µl a été assemblé. La réaction de PCR s'est déroulée sur 40 cycles d'amplification identiques sur un appareil à PCR de type *Whatman Biometra T-Gradient* : 15 secondes de dénaturation à 94°C, 45 secondes d'appariement au T_m et une élongation de 30 secondes à 72°C. Les cycles d'amplification ont été précédés d'une phase de dénaturation à 95°C d'une durée de 5 minutes et suivis d'une phase d'élongation de 6 minutes à 72°C. Les produits de la réaction ont été migrés sur un gel d'agarose à 1% contenant 0,33 µg/ml de bromure d'éthidium (Sigma), et les bandes obtenues ont été extraites à l'aide de la trousse *QIAquick Gel Extraction*. Les gènes ont finalement été introduits dans le vecteur pGEM-T à l'aide de la trousse de clonage *pGEM-T Easy Vector System I* (Promega) et selon les indications du manufacturier. Les plasmides obtenus ont été vérifiés par une digestion avec l'enzyme de restriction PvuII (New England Biolabs).

2.5.4 Réaction de PCR quantitatif en temps réel

Tableau VII : Oligonucléotides utilisés pour le PCR quantitatif en temps réel

Gènes	Oligonucléotides	Températures d'appariement (°C)
PAI-1	Sens : 5'-TGCTGGTGAATGCCCTCTACT-3' Anti-sens : 5'-CGGTCATTCCCAGGTTCTCTA-3'	60
Furine	Sens : 5'-CTACACAGGGCACGGCATTG-3' Anti-sens : 5'-CCACACCTACACCACAGACA-3'	66
VEGF	Sens : 5'-CTTGCCTTGCTGCTCTACCTC-3' Anti-sens : 5'-GCACACAGGATGGCTTGAA-3'	64
MT1-MMP	Sens : 5'-CCAGGGTCTCAAATGGCAACATAATGAAA-3' Anti-sens : 5'-CCATGGAAGCCCTCGGCAAA-3'	66
RPL-P0	Sens : 5'-GATTACACCTTCCCACTTGC-3' Anti-sens : 5'-CCAAATCCCATATCCTCGTCCG-3'	61

Pour la réaction de PCR quantitatif en temps réel, le mélange était constitué de 1 μ M de chaque oligonucléotide, d'un tampon de PCR pour obtenir une concentration finale de magnésium de 2,5 mM, de 200 μ M de dNTP, de 1,6 μ l de SybrGreen (Corbett Research, Kirkland, Québec, Canada), de 1,0 U de Taq polymérase et de 1 μ l d'ADN complémentaire ou de 1 μ l d'un échantillon d'une des 2 courbes standard pour un volume final de 50 μ l. À partir du mélange de 50 μ l, 2 tubes de 25 μ l ont été aliquotés et amplifiés. Les conditions d'amplification ont été les mêmes que celles utilisées lors des PCR précédemment réalisés afin de cloner les gènes. La réaction s'est déroulée dans un appareil de type *Rotor Gene 3000* (Corbett Research). Après l'acquisition, les concentrations relatives des gènes ont été calculées par le logiciel *Rotor Gene 6,0* associé à l'appareil.

2.6 Immunofluorescence

Tableau VIII : Anticorps utilisés pour l'immunofluorescence

Anticorps primaire	Dilution de l'anticorps primaire	Anticorps secondaire	Dilution de l'anticorps secondaire
α -Actine (Sigma)	1 :200	IgG de lapin couplé à la rhodamine TRITC (ImmunoResearch Jackson Laboratories, West Grove, Pennsylvanie, U.S.A.)	1 :200
α -PAN-cadhérine (Sigma)	1 :200	IgG de lapin couplé à la rhodamine TRITC	1 :200
A-Vimentine (Donné par le laboratoire du Dre Rivard)	1 :200	IgG de souris couplé à Cy2	1 :200
α -Smad3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californie, U.S.A.)	1:150	IgG de chèvre couplé à la rhodamine Red-X	1 :200
α -p-Smad2 (Cell Signalling Technology)	1:75	IgG de lapin couplé à la rhodamine TRITC	1 :200

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits contenant une lamelle de verre 48 heures avant le marquage. Les cellules HT1080 ont étéensemencées à une confluence de $1,0 \times 10^5$ cellules par puits, les cellules HEK 293 ont été diluées dans un rapport 1/5, les cellules HepG2 ont étéensemencées à une confluence de $9,0 \times 10^4$

cellules par puits et les cellules NIH 3T3 à une confluence de $1,0 \times 10^5$ cellules par puits. Les cellules ont été sevrées et, le cas échéant stimulées avec 5 ng/ml de TGF β , 16 heures avant le marquage.

Les lamelles ont été trempées rapidement 5 fois dans la solution de lavage (PBS contenant 1 mM de CaCl₂ et 1 mM de MgCl₂) avant d'être déposées dans des plaques à 6 puits. Les cellules ont ensuite été fixées 15 minutes à -20°C dans une solution méthanol : acétone 30 :70 v/v. Elles ont été séchées 10 minutes sous la hotte, puis lavées 1 minute dans la solution de lavage. Ensuite, elles ont été réhydratées 15 minutes dans la solution de lavage. Elles ont été perméabilisées 5 minutes dans une solution de PBS contenant 0,1% de triton X-100 (MP-Biomedicals, Ohio, U.S.A.). Elles ont ensuite été lavées une fois pendant 1 minute et une fois pendant 5 minutes avec la solution de lavage. Les lamelles ont été bloquées 30 minutes à la température ambiante dans une solution de PBS contenant 2% de BSA (Sigma). Ensuite, les cellules ont été incubées 2½ heures à la température ambiante avec l'anticorps primaire de type IgG. Les anticorps utilisés et leur concentration sont présentés au tableau VIII. Les cellules ont été lavées 3 fois pendant 1 minute avec la solution de lavage afin de retirer l'excédant d'anticorps primaire. Pour toutes les étapes subséquentes, les cellules ont été gardées à la noirceur. Les cellules ont été incubées pendant 1 heure à la température ambiante avec l'anticorps secondaire. Afin d'enlever l'excédant d'anticorps, les cellules ont été lavées 3 fois pendant 1 minute avec la solution de lavage. Elles ont ensuite été immergées pendant 2 minutes dans une solution de PBS contenant des traces de Dapi (*4',6-diamino-2-phenylindole, dilactate*) (Invitrogen). Elles ont été à nouveau lavées 3 fois pendant 5 minutes dans la solution de

lavage. Enfin, les lamelles ont été montées sur des lames de microscopie de type *Premium Fisherfinest* (Fisher Scientific) avec une goutte de protecteur de type *FluoroGuard* (Bio-Rad). Les lames ont été conservées à la noirceur à 4°C jusqu'à la prise de micrographies.

2.7 Incorporation de thymidine

Les cellules ont étéensemencées 48 heures avant l'essai dans une plaque à 96 puits à raison de $4,0 \times 10^3$ cellules par puits. Lorsqu'indiqué, les cellules ont été sevrées et stimulées avec 2 ng/ml de TGF β 16 heures avant l'essai. La thymidine tritiée à 37 MBq/ml (PerkinElmer, Houston, U.S.A.) a été diluée 1/100 dans du PBS stérile avant d'être distribuée à raison de 10 μ l par puits. Les cellules ont été incubées 8 heures avec la thymidine tritiée dans l'incubateur à 37°C et à 5% de CO $_2$. Le milieu a été retiré et les cellules ont été décollées avec une solution de trypsine à 0,3% à 37°C pendant 5 minutes. Ensuite, les cellules ont été récupérées sur un filtre de type *Unifilter 96* (PerkinElmer) à l'aide d'un appareil de type *Filtermate Harvester* (PerkinElmer). Le filtre contenant les cellules a été séché pendant 1 heure sous la hotte, puis le liquide à scintillation (PerkinElmer) a été ajouté dans chaque puits. Le filtre scellé a été lu à l'aide d'un lecteur de type *TopCount NXT – Microplate Scintillation & Luminescence Counter* (PerkinElmer).

2.8 Essai d'invasion sur une matrice de collagène

2.8.1 Préparation des filtres

Le collagène de type IV (Sigma) a été dilué dans de l'acide acétique glacial 0,1 M pour obtenir une solution à 10 %. La solution a été maintenue sur glace pendant toute la préparation des filtres. Les filtres PVPF (GE Osmonics, Oakville, Ontario, Canada) utilisés ont 13 mm de diamètre et des pores de 8 μm . Les filtres ont été étalés dans une boîte de pétri propre de 150 X 20 mm (Sarstedt) en prenant soin de placer le côté mâle toujours sur le dessus. La solution de collagène a été déposée uniformément sur la surface de chaque filtre à l'aide d'une micropipette à raison de 100 μl par filtre. Les filtres ont été placés à 37°C pendant 1 heure. Ensuite, chaque filtre a été rincé dans de l'eau distillée pour enlever l'excédant de collagène puis déposé dans une nouvelle boîte de pétri propre.

2.8.2 L'essai d'invasion

Les cellules HT1080 ont étéensemencées 48 heures avant l'essai à raison de $1,0 \times 10^5$ cellules par boîte de pétri de 100 X 20 mm. Les chambres de Boyden ont été utilisées pour la migration. Un volume de 200 μl de milieu MEM contenant 0,1% de BSA a été déposé dans les chambres inférieures. Ensuite, les filtres ont été déposés sur la surface du milieu. Les cellules trypsinisées puis resuspendues dans du milieu MEM contenant 0,1% de BSA pour obtenir une concentration de $8,0 \times 10^4$ cellules dans 100 μl ont été déposées au centre du filtre. Les chambres ont été placées dans un incubateur à 37°C et 5% de CO_2 pendant 1 heure pour laisser adsorber les cellules sur le filtre. Le volume de milieu

de la chambre supérieure a ensuite été complété à 200 μ l et l'essai s'est poursuivi dans l'incubateur pendant 6 heures.

L'essai a été arrêté en aspirant le milieu contenu dans la chambre supérieure et en grattant les cellules sur le dessus du filtre à l'aide d'un coton-tige. Les cellules ayant migrées et se trouvant de l'autre côté du filtre ont été fixées à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde (Polysciences, Warrington, Pennsylvanie, U.S.A.) à 4% pendant 15 minutes à la température ambiante. Elles ont ensuite été perméabilisées pendant 10 minutes à la température ambiante dans du méthanol 100% (Fisher Scientific). Enfin, elles ont été colorées dans une solution de cristal violet (Sigma) à 1% pendant 10 minutes à la température ambiante puis rincées dans de l'eau distillée. Les filtres ont été déposés sur une lame de microscopie (Surgipath, Winnipeg, Manitoba, Canada) et les cellules ont été comptées dans 10 champs aléatoires à un grossissement de 400X.

Pour les essais visant à déterminer les types de migrations employés par les transfectants stables, des inhibiteurs ont été utilisés. Les inhibiteurs ont été ajoutés dans le milieu des chambres inférieures et supérieures au début des essais. Pour inhiber la migration de type mésenchymal, une combinaison du cocktail d'inhibiteur *Mini-Complete* et de l'inhibiteur des métalloprotéases GM6001 (VWR Canlab, Montréal, Québec, Canada) à une concentration finale de 25 μ M a été utilisée. Pour inhiber la migration de type amoeboïde, l'inhibiteur de ROCK Y-27632 (Sigma) à une concentration finale de 10 μ M a été utilisé.

2.9 Zymographie

Les cellules HT1080 ont étéensemencées 48 heures avant l'essai à raison de $7,5 \times 10^4$ cellules par puits dans une plaque à 24 puits ; elles ont été sevrées et, lorsqu'indiqué, stimulées avec 2 ng/ml de TGF β et/ou 30 μ g/ml de concanavaline A (ConA) 16 heures avant l'essai. Les surnageants ont été récupérés puis centrifugés à 13 000 rpm à 4°C pendant 15 minutes. Les surnageants ont été mélangés dans un rapport 5 :1 avec le tampon de chargement à pH 7,4 (0,5 M de Tris-HCl, 10% de SDS et 50% de glycérol) puis incubés à 37°C pendant 15 minutes. Les échantillons ainsi préparés ont été déposés sur un gel utilisé pour l'immunobuvardage de type Western contenant 0,1% de gélatine. La migration s'est déroulée à 140 V pendant environ 5 heures. Les gels ont ensuite été lavés 2 fois avec agitation pendant 1 heure à la température ambiante dans une solution de Triton X-100 (MP-Biomedicals) à 2,5%. Ils ont ensuite été rincés une dizaine de fois à l'eau distillée avant d'être incubés avec agitation douce à 37°C pendant 20 heures dans la solution d'activation enzymatique à pH 7,4 (50 mM de Tris-HCl et 5 mM de CaCl $_2$). Les gels ont ensuite été colorés 15 à 30 minutes dans une solution de bleu de Coomassie R250 (EM Sciences, New Jersey, U.S.A.) à 0,5% puis décolorés dans une solution à 30% de méthanol et 10% d'acide acétique glacial.

2.10 Formation d'invadopodes

2.10.1 Préparation des lamelles

Les lamelles de verre ont d'abord été enduites de gélatine à 0,2% diluée dans le PBS pendant 10 minutes à la température ambiante. Il s'agit en fait d'un mélange de gélatine marquée à l'*Oregon Green* (Invitrogen) et de gélatine non-marquée, toutes deux provenant de peau de cochon (Sigma). Par la suite, les lamelles ont été placées dans des plaques à 6 puits et lavées au PBS avant d'être incubées pendant 15 minutes à 4°C dans une solution de glutaraldéhyde (Sigma) à 0,5%. Les lamelles ont à nouveau été lavées au PBS puis incubées pendant 15 minutes à la température ambiante dans une solution de borohydrure de sodium (Fisher Scientific) à 5 mg/ml. Elles ont ensuite été lavées au PBS, puis incubées une heure dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂ avec du milieu MEM contenant 10% de FBS.

2.10.2 L'essai de formation d'invadopodes

Le milieu de chaque puits a été aspiré et les cellules HT1080 ont étéensemencées à raison de $4,0 \times 10^4$ cellules par puits dans 50 µl de milieu MEM sans sérum. Les cellules ont été incubées 30 minutes dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂ pour permettre leur adhésion aux lamelles. Le volume de milieu a ensuite été complété à 2 ml et les cellules ont été incubées pendant encore 10 heures dans le même incubateur. Les lamelles ont ensuite été lavées au PBS, puis les noyaux ont été marqués au Dapi pendant 5 minutes à la température ambiante dans les plaques à 6 puits tel que décrit précédemment dans la section concernant l'immunofluorescence et l'actine a été marquée à la phalloïdine-rhodamine (fournie par le laboratoire de Dr Parent) à une concentration de 1/500 pendant 30 minutes à la température ambiante sur une feuille de paraffine. Les lamelles ont été

lavées une dernière fois au PBS avant d'être montées sur des lames de microscopie de type *Premium Fisherfinest* avec une goutte de protecteur de type *FluoroGuard*. Les lames ont été conservées à la noirceur à 4°C jusqu'à la prise de micrographies. Les micrographies ont été prises à l'aide d'un microscope à fluorescence de type Leica à des grossissements de 160 X et de 400 X.

2.11 Essai de motilité cellulaire par rétrécissement des plaies

Les cellules ont étéensemencées 48 heures avant l'essai à raison de $3,0 \times 10^5$ cellules par boîte de pétri de 60 X 20 mm (Sarstedt). Le milieu a été aspiré puis une blessure a été formée dans le fond de la boîte de pétri à l'aide d'un embout de 200 µl (Sarstedt) relié à une pompe à vide. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois avec du PBS puis recouverte de milieu MEM contenant 0,2 % de FBS. Lorsqu'indiqué, les cellules ont été stimulées avec 2 ng/ml de TGFβ. Les cellules ont été incubées pendant 24 heures à 37°C et à 5% de CO₂. Elles ont été observées à différents temps soit tout de suite après la formation de la blessure, puis 8, 12 et/ou 24 heures après. Elles ont été observées de 2 façons : en contraste de phase et par un marquage de l'actine en immunofluorescence.

2.11.1 Contraste de phase

Les cellules en mouvement ont été observées en contraste de phase à l'aide d'un microscope à fluorescence de type Leica à un grossissement de 160X afin de voir l'évolution de la blessure. Les cellules ayant migré au centre de la blessure ont été

dénombrées. Pour ce faire, pour chaque transfectant stable, trois micrographies ont été sélectionnées et placées côte à côte : une au temps 0 hres, une au temps 12 hres et une au temps 24 hres. Un trait a été tiré à la base de chaque côté de la blessure à partir de la micrographie du temps 0 hres jusqu'à celle du temps 24 hres. Toutes les cellules se situant entièrement entre les deux traits ont été comptées.

2.11.2 Marquage de l'actine en immunofluorescence

Les cellules ont étéensemencées dans plusieurs boîtes de pétri contenant une lamelle de verre et les blessures ont toutes été faites au même temps sur les lamelles. Ensuite, le marquage a été fait sur une lamelle différente à chacun des temps. Le marquage de l'actine a été effectué tel que décrit précédemment dans la section concernant l'immunofluorescence. Les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope à fluorescence à un grossissement de 100X afin de visualiser l'évolution de la blessure et à 1000X pour voir la réorganisation du cytosquelette d'actine des cellules ayant migrées dans la blessure.

2.12 Essai d'adhésion cellulaire

Les cellules HT1080 ont étéensemencées 72 heures avant l'essai à raison de $3,0 \times 10^5$ cellules par boîte de pétri de 150 X 20 mm. Le collagène de type IV a été dilué dans une solution d'acide acétique glacial 0,1 M pour obtenir une concentration de 100 µg/ml. Une plaque à 96 puits a été incubée pendant 1 heure à 37°C et 5 % de CO₂, puis pendant

16 heures à 4°C avec 200 µl de la solution de collagène ou de milieu MEM contenant 2 % de BSA. L'excédant de collagène ou de milieu a été aspiré et la plaque a été bloquée à 37°C pendant 2 heures avec du milieu MEM contenant 2% de BSA. Le milieu a été aspiré. Les cellules ont été resuspendues dans du milieu MEM contenant 0,2% de BSA puisensemencées dans la plaque à 96 puits à raison de $6,0 \times 10^4$ cellules par puits. La plaque contenant les cellules a été incubée pendant 2 heures à 37°C et à 5% CO₂. Les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS puis colorées pendant 30 minutes à l'aide d'une solution de cristal violet à 0,5%. Elles ont à nouveau été lavées 2 fois avec du PBS pour ensuite être solubilisées pendant 16 heures à la température ambiante dans une solution de SDS à 1%. La plaque a été lue à l'aide d'un lecteur de plaque à une densité optique de 570 nm.

2.13 Essai de morphologie cellulaire

Des boîtes de pétri de 60 X 20 mm ont été utilisées. Une solution de collagène de type IV à 100 µg/ml diluée dans l'acide acétique à 0,1 M a été déposée dans les boîtes de pétri. Celles-ci ont été incubées pendant une heure dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂ pour permettre au collagène de polymériser. Par la suite, les boîtes de pétri ont été incubées pendant 16 heures à 4°C. L'excédant de collagène de type IV a été aspiré et les boîtes de pétri ont été lavées deux fois avec du PBS stérile. Elles ont ensuite été bloquées pendant 2 heures dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂ avec du milieu MEM sans FBS contenant 2% de BSA. Les cellules HT1080 ont été ensemencées dans les boîtes de pétri à une confluence de $1,5 \times 10^5$ cellules par boîte de pétri après avoir aspiré le milieu

MEM sans FBS à 2% de BSA. Les cellules ont été observées par microscopie en contraste de phase à un grossissement de 160 X à différents temps, soit à 2 heures, 26 heures, 50 heures et 74 heures. Cinq champs aléatoires ont été photographiés pour chaque boîte de pétri à chaque temps. Deux champs ont été choisis à chaque temps et les cellules ont été dénombrées selon leur phénotype.

2.14 Dosage du TGF β bioactif par ELISA

Les cellules HT1080 ont étéensemencées 72 heures avant l'essai à raison de $5,0 \times 10^4$ cellules par puits d'une plaque à 12 puits (Sarstedt) et sevrées 18 heures avant la récupération des surnageants. Les surnageants récupérés ont été centrifugés pendant 15 minutes à 13 000 rpm à 4°C. Le dosage a été effectué à l'aide de la trousse ELISA *Human TGF β 1 Quantikine* (R&D Systems) et selon les indications du fabricant. Les cellules de chaque puits ont été trypsinisées puis comptées. Ensuite, les cellules ont été lavées avec 1 ml de PBS stérile avant d'être centrifugées à 980 g pendant 15 minutes à la température ambiante. Les culots de cellules ont été resuspendus dans 35 μ l de tampon de lyse de type Ripa décrit dans la section concernant le buvardage de type Western, puis incubés avec agitation à 4°C pendant 30 minutes. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 13 000 rpm à 4°C pendant 30 minutes et les surnageants, contenant les protéines, ont été récupérés. La concentration protéique des lysats de cellules ainsi obtenus a été déterminée à l'aide de la trousse de dosage *BCA Protein Assay* (Pierce). La production de TGF β bioactif a été calculée en ng/ml de surnageant, en ng/cellule et en ng/mg de protéine.

2.15 *Modèle de progression tumorale*

2.15.1 Préparation des cellules

Les cellules ont été décongelées 1 semaine avant l'injection des souris. Elles ont été maintenues dans du milieu MEM sans antibiotique contenant 10% de FBS. Pour les injections, les cellules ont été lavées au PBS, trypsinisées, puis resuspendues dans du milieu MEM à une concentration de $2,25 \times 10^4$ cellules/ μ l. Les seringues de 1 cc (VWR International) ont été remplies avec 100 μ l de cellules, puis maintenues sur glace dans du papier d'aluminium préalablement stérilisé à l'éthanol 70% jusqu'à l'injection.

2.15.2 Injection des souris

Les souris nu/nu femelles (Charles River, Wilmington, Massachusetts, U.S.A.) âgées entre 35 et 56 jours ont été endormies par une injection de 100 μ g/g d'une solution de kétamine/xylazine (Bioniche Animal Health, Ontario, Canada) avant d'être injectées de façon sous-cutanée en 4 points sur le dos.

2.15.3 Incidence et croissance tumorale

La croissance tumorale a été évaluée en mesurant les tumeurs 3 fois par semaine. Les mesures ont débuté une semaine après les injections. Le volume approximatif des

tumeurs a été calculé à l'aide de la formule $0,5 \times L \times l^2$ où L représente la longueur et l, la largeur. L'incidence des tumeurs a été déterminée en comptant le nombre de tumeurs présentes sur chaque souris. L'incidence des métastases a été déterminée en vérifiant la présence de métastases ou de nodules dans le poumon droit et dans les 2 lobes supérieurs du foie des souris.

2.15.4 Extraction des protéines et de l'ARN messager des tumeurs

Les souris ont été endormies par une injection péritonéale de 100 µg/g d'une solution de kétamine/xylazine. Les tumeurs ont ensuite été excisées et pesées. Elles ont été coupées en 2 morceaux. Le premier morceau a été utilisé pour l'extraction des protéines et le second pour l'extraction de l'ARNm.

Pour l'extraction des protéines, le morceau de tumeur a été mis dans un tampon de lyse Ripa contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases décrit précédemment dans la section concernant l'immunobuvardage de type Western. Le mélange a été homogénéisé sur glace à l'aide d'un appareil de type Polytron (Brinkmann Instruments, Ontario, Canada). Une fois homogène, l'homogénat a été incubé sur glace pendant 30 minutes. Au cours de l'incubation, les homogénats ont été mélangés doucement toutes les 5 minutes à l'aide d'un vortex. Ils ont ensuite été centrifugés à 4°C à 13 000 rpm pendant 30 minutes. Les surnageants ont été récupérés et dosés à l'aide de la trousse *BCA Protein Assay*.

Pour l'extraction de l'ARNm, le morceau de tumeur a été mélangé au réactif TRIzol (Invitrogen). Le mélange a été homogénéisé à l'aide d'un appareil de type Polytron dont la tige métallique a préalablement été stérilisée à l'éthanol 70%. Les homogénats ont été incubés pendant 5 minutes à la température ambiante avant d'être congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation. La suite de l'extraction s'est déroulée telle que décrit précédemment dans la section concernant le PCR quantitatif en temps réel.

2.16 Analyse statistique

L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide du logiciel SigmaStat 3.0. Le test de Student (*t-test*) non-pairé a été utilisé avec un degré de confiance de 0,05. Lorsque plus de deux groupes étaient comparés, une seconde analyse statistique a été effectuée à l'aide du test de variance (ANOVA) pour reconfirmer les résultats obtenus avec le premier test.

3. Résultats

3.1 Caractérisation du modèle cellulaire utilisé

3.1.1 Caractérisation phénotypique des cellules HT1080

Le TGF β peut avoir des effets différents d'un type cellulaire à l'autre (Murphy et al, 2004). Les cellules choisies pour l'étude, soit les cellules HT1080, sont issues d'un fibrosarcome comprenant à la fois des cellules épithéliales et des fibroblastes. Avant de commencer l'étude, il était donc pertinent de caractériser le phénotype des cellules HT1080. Pour ce faire, les cellules HT1080 ont été comparées à deux autres lignées cellulaires humaines, les HEK 293, des cellules épithéliales normales, les HepG2, des cellules épithéliales cancéreuses et à une lignée cellulaire murine, les NIH 3T3, des fibroblastes normaux. Pour chacune de ces lignées, l'expression du marqueur de dédifférenciation vimentine, la présence de cadhérines aux jonctions intercellulaires et l'organisation de l'actine ont été observées par immunofluorescence.

Tel que démontré à la figure 13, chez les fibroblastes NIH 3T3, on retrouve peu d'actine et celle-ci est localisée principalement de façon nucléaire alors que chez les cellules épithéliales HEK 293 et HepG2, on observe une plus forte expression et une localisation majoritairement aux jonctions intercellulaires.

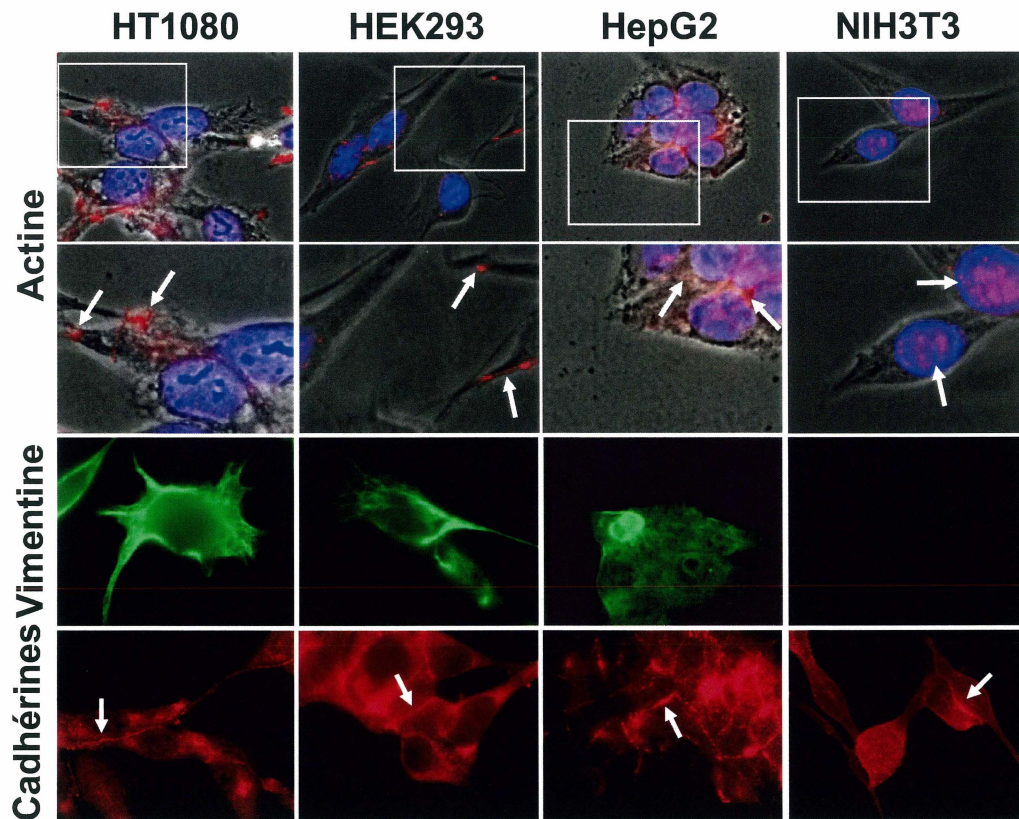


Figure 13 : Caractérisation phénotypique du modèle cellulaire utilisé. L'organisation de l'actine, l'expression de la vimentine et la présence des cadhérines aux jonctions cellulaires chez les cellules HT1080 ont été comparées à celles des cellules épithéliales HEK 293 et HepG2 et à celles des cellules fibroblastiques NIH 3T3 par immunofluorescence. Les micrographies ont été prises à un grossissement de 1000 X à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les micrographies présentées constituent un champ représentatif sur 10. Les micrographies illustrant l'organisation de l'actine constituent une superposition des cellules observées en contraste de phase (visible), des noyaux marqués au Dapi (bleu) et de l'actine (rouge) marquée par immunofluorescence indirecte. La seconde micrographie constitue un agrandissement de la section encadrée.

Chez les cellules HT1080, on observe une expression de l'actine similaire à celle des cellules épithéliales HEK 293. Cette actine se retrouve principalement aux jonctions intercellulaires. En figure 13, on peut également observer l'expression de la vimentine. On remarque que ce marqueur est fortement exprimé chez les cellules épithéliales HEK 293 et HepG2. Par contre, on ne retrouve aucune expression de vimentine chez les cellules fibroblastiques NIH 3T3. Une micrographie dans le visible a permis de confirmer la présence des cellules (résultat non présenté). Il peut paraître surprenant que la vimentine ne soit pas présente chez les cellules embryonnaires NIH 3T3 étant donné son rôle de marqueur mésenchymal, mais ceci peut peut-être s'expliquer par l'origine de ces cellules. Chez la souris, la vimentine est exprimée à partir du jour E8,5 (Duprey et Paulin, 1995). Par contre, elle n'est exprimée que chez les cellules mésenchymales primaires et les précurseurs des cellules nerveuses (Franke et al, 1982 ; Duprey et Paulin, 1995). Les cellules mésenchymales primaires sont les précurseurs de plusieurs types cellulaires dont les chondrocytes, les adipocytes, les ostéoblastes et les myocytes (Zipori, 2004). Or les cellules NIH 3T3 sont de type fibroblastique et n'appartiennent donc pas à ces types cellulaires. Il est donc normal que la vimentine soit absente chez ces cellules.

Les cellules HT1080 expriment la vimentine de façon comparable aux cellules HEK 293 et HepG2. Enfin, on retrouve des cadhérines au niveau des jonctions intercellulaires des quatre lignées cellulaires. Par contre, elles sont plus fortement exprimées chez les cellules HEK 293 et les cellules NIH 3T3 que chez les cellules HepG2 et les cellules HT1080.

Tableau IX : Caractéristiques phénotypiques des cellules HT1080

Marqueurs	Caractéristiques observées chez les HT1080	Conclusions
Actine	Localisation aux jonctions cellulaires	Similaire aux cellules épithéliales
Vimentine	Expression de la vimentine	Indice de dédifférenciation
Cadhérines	Expression faible Jonctions discontinues	Similaire aux cellules cancéreuses HepG2 Indice de dédifférenciation partielle

Ces résultats suggèrent que les cellules HT1080 ont un phénotype épithélial partiellement dédifférencié puisqu'elles partagent des caractéristiques à la fois avec les cellules HEK 293, qui ont un phénotype normal, et les cellules HepG2, qui ont un phénotype transformé. En effet, les cellules HT1080 ont une organisation de l'actine similaire à celle des cellules HEK 293, des cellules épithéliales normales de rein, soit principalement localisée aux jonctions cellulaires. De plus, les cellules HT1080 expriment de la vimentine de façon similaire aux cellules HEK 293 et HepG2 qui sont respectivement des cellules épithéliales normales et transformées. Toutefois, la vimentine se retrouve de façon plus importante à la membrane plasmique chez les cellules HT1080, une organisation plus près de celle des cellules HEK 293. Enfin, les cellules HT1080 se comparent plus particulièrement aux cellules HepG2, des cellules épithéliales cancéreuses de foie, en ce qui a trait à la présence des cadhérines aux jonctions intercellulaires. En effet, ces deux types cellulaires expriment faiblement des cadhérines

aux jonctions intercellulaires et ce, de façon discontinue. Les caractéristiques phénotypiques des cellules HT1080 qui permettent de conclure à un phénotype épithélial partiellement dédifférencié sont résumées au tableau IX.

3.1.2 Réponse au TGF β des cellules HT1080

La réponse au TGF β diminue fréquemment au cours de la progression tumorale dû à des aberrations soit au niveau des récepteurs ou des voies de signalisations (Pasche, 2001). Il était donc important de vérifier si les cellules HT1080 répondent à la stimulation par le TGF β . Pour ce faire, les cellules HT1080 ont été incubées avec des concentrations croissantes de TGF β et l'effet de cette stimulation a été évalué par la capacité de prolifération, d'adhésion et d'invasion des cellules.

Dans le processus tumoral, la première étape consiste normalement en une prolifération accrue d'un clone cellulaire (Yokota et Sugimura, 1993). La capacité de prolifération des cellules HT1080 en réponse au TGF β a donc été le premier facteur vérifié. Les cellules ont été stimulées au TGF β 16 heures avant le début de l'essai. Par la suite, la prolifération a été évaluée par l'incorporation de thymidine tritiée. Tel que présenté à la figure 14, le TGF β augmente la prolifération des cellules HT1080 à de faibles concentrations, c'est-à-dire à des concentrations inférieures à 5 ng/ml. Des concentrations supérieures de TGF β ont un effet promoteur plus modéré sur la prolifération des cellules HT1080, voire aucun effet à des concentrations de 40 ng/ml.

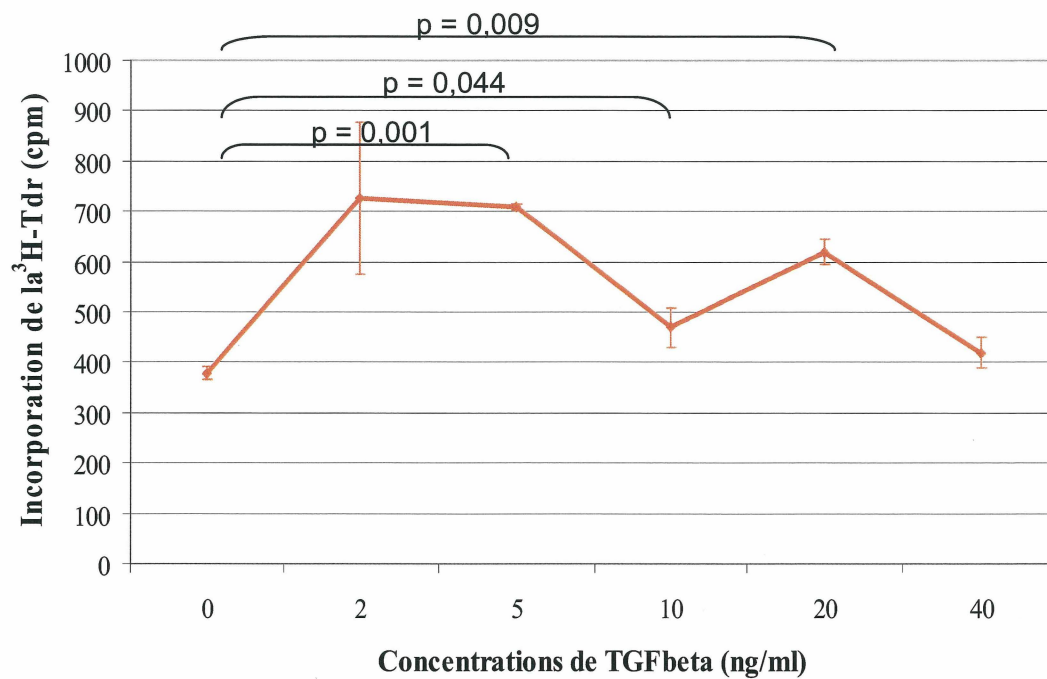


Figure 14 : Impact du TGFβ sur la prolifération des cellules HT1080. La prolifération des cellules HT1080 a été évaluée par une incorporation de thymidine tritiée de 8 heures à la suite d'une stimulation de 16 heures avec des concentrations croissantes de TGFβ. Les résultats sont représentatifs de 2 à 3 expériences effectuées en duplicata pour les concentrations de 2 et 5 ng/ml de TGFβ exogène.

La seconde étape dans le processus tumoral consiste en l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (Albini et al, 2004). Cette adhésion est nécessaire pour les étapes subséquentes d'invasion cellulaire. L'effet du TGF β sur la capacité d'adhésion des cellules HT1080 sur une matrice de collagène, soit le collagène de type IV, a donc été évalué à la suite d'une stimulation de 16 heures avec des concentrations croissantes de cette cytokine. Tel que démontré à la figure 15, à la suite d'une stimulation des cellules HT1080 avec des concentrations de TGF β égales ou inférieures à 10 ng/ml, on observe une augmentation importante de la capacité d'adhésion de ces cellules sur une matrice de collagène. Une stimulation de ces mêmes cellules avec des concentrations plus fortes de TGF β entraîne une augmentation de la capacité d'adhésion à la matrice de collagène, mais dans une moindre mesure.

L'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire peut leur permettre d'interagir avec celle-ci et de débiter l'invasion mésenchymale pour atteindre la circulation sanguine (Nyberg et al, 2002). L'effet du TGF β sur la capacité d'invasion des cellules HT1080 sur une matrice de collagène a donc été évalué. Pour ce faire, les cellules ont été stimulées 16 heures avant l'essai avec des doses croissantes de TGF β . Ensuite, elles ont été ensemencées sur un filtre recouvert de collagène de type IV. L'essai a été effectué sur une période de 7 heures, puis les cellules invasives ont été comptées. Ce type de collagène a été choisi parce qu'il est un des principaux constituants, avec la laminine, de la membrane basale, première zone que les cellules tumorales doivent traverser au cours de l'invasion (Santos García et al, 2006).

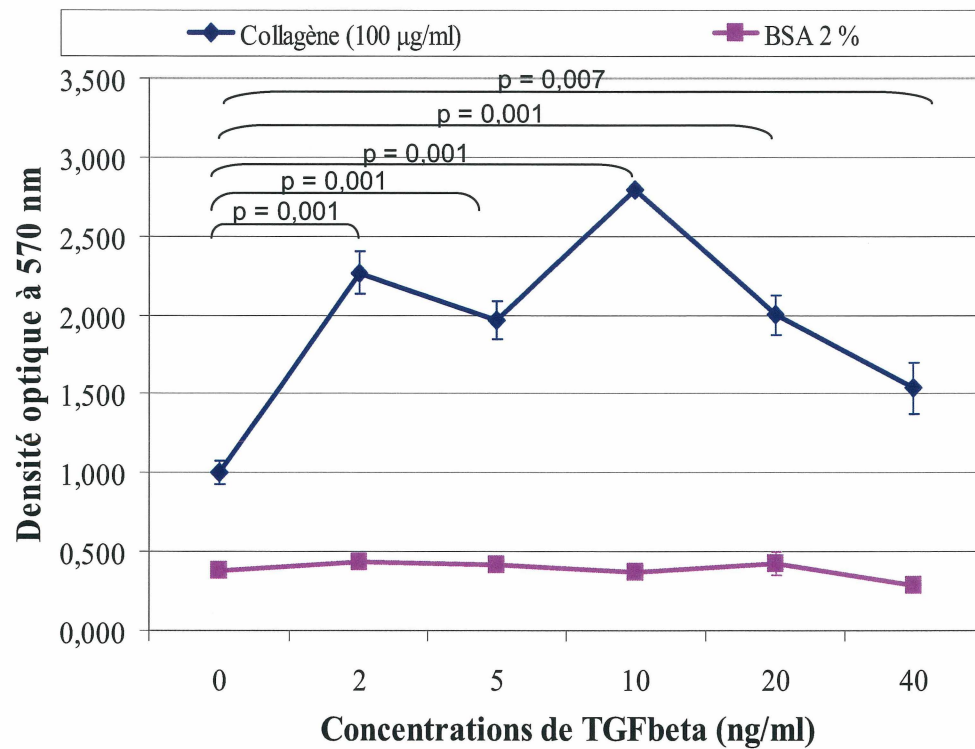


Figure 15 : Impact du TGFβ sur la capacité d'adhésion des cellules HT1080 à une matrice de collagène. L'essai d'adhésion a été réalisé sur une matrice de collagène de type IV à une concentration de 100 µg/ml pendant 2 heures. Les cellules ont été pré-stimulées avec des concentrations croissantes de TGFβ pendant 16 heures. L'expérience a été effectuée en triplicata.

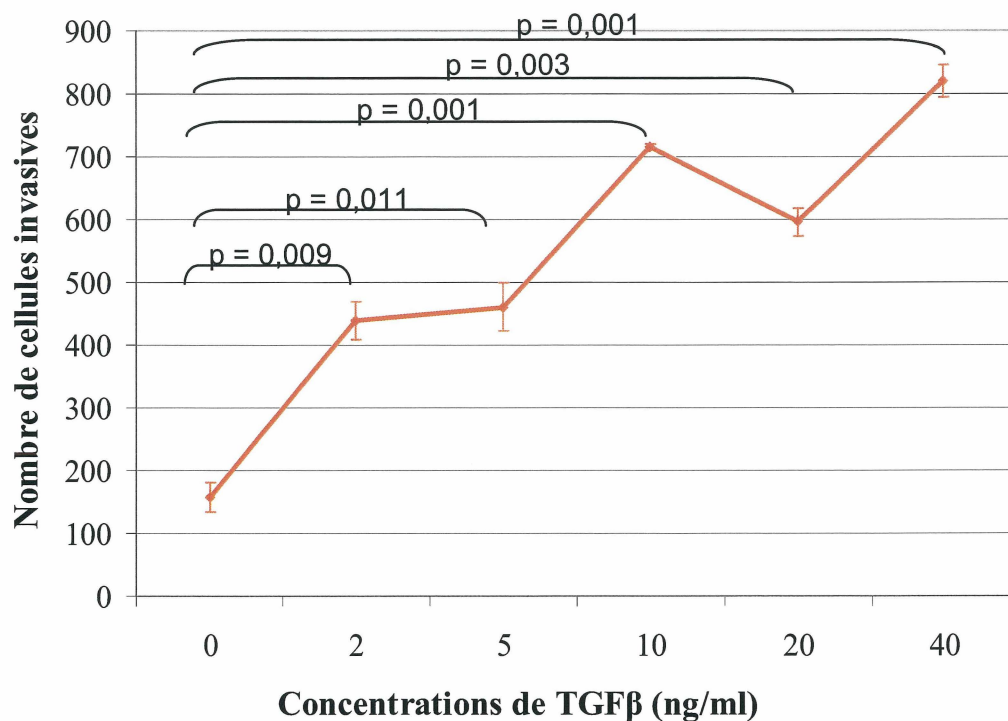


Figure 16 : Impact du TGFβ sur la capacité d'invasion des cellules HT1080. L'essai d'invasion a été réalisé dans des chambres de Boyden sur une matrice de collagène de type IV à une concentration de 100 µg/ml pendant 7 heures. Les cellules ont été pré-stimulées 16 heures avant l'essai et stimulées pendant toute la durée de l'essai avec des concentrations croissantes de TGFβ. L'expérience a été effectuée en duplicata. L'effet de 2 ng/ml de TGFβ sur la capacité d'invasion des cellules HT1080 a été confirmé dans 5 expériences indépendantes réalisées selon des conditions expérimentales identiques.

Plus précisément, le collagène de type IV se concentre dans la lamina basale au niveau entre autres des vaisseaux sanguins et des épidermes (Laurie et al, 1982). Il est à noter qu'un autre type de collagène, soit le collagène de type VII, peut également être exprimé au niveau de la membrane basale, mais dans une moindre mesure (Santos García et al, 2006). Tel que démontré à la figure 16, le TGF β augmente le caractère invasif des cellules HT1080 et ce, à toutes les concentrations utilisées. L'invasion cellulaire dépend de deux facteurs principaux, soit la production de métalloprotéases et la motilité cellulaire (Wolf et al, 2003). L'effet du TGF β sur ces deux facteurs a donc été évalué. D'abord la production de MMP-2 par les cellules HT1080 à la suite d'une stimulation de 16 heures avec des concentrations croissantes de TGF β a été étudiée par zymographie. On remarque à la figure 17 que la production de la forme immature de la MMP-2 (pro-MMP-2) ne semble pas augmenter à la suite d'une stimulation au TGF β , alors que la forme active augmente graduellement en fonction de la concentration du facteur de croissance.

Par la suite, la motilité des cellules HT1080 a été évaluée avec ou sans préstimulation avec des concentrations croissantes de TGF β en utilisant la technique de rétrécissement des plaies. L'essai s'est déroulé sur une période de 24 heures, précédée ou non d'une stimulation de 16 heures au TGF β . Une blessure a été formée dans une boîte de pétri confluente de cellules HT1080 et la fermeture de la blessure a été observée tout au long de la période de 24 heures.

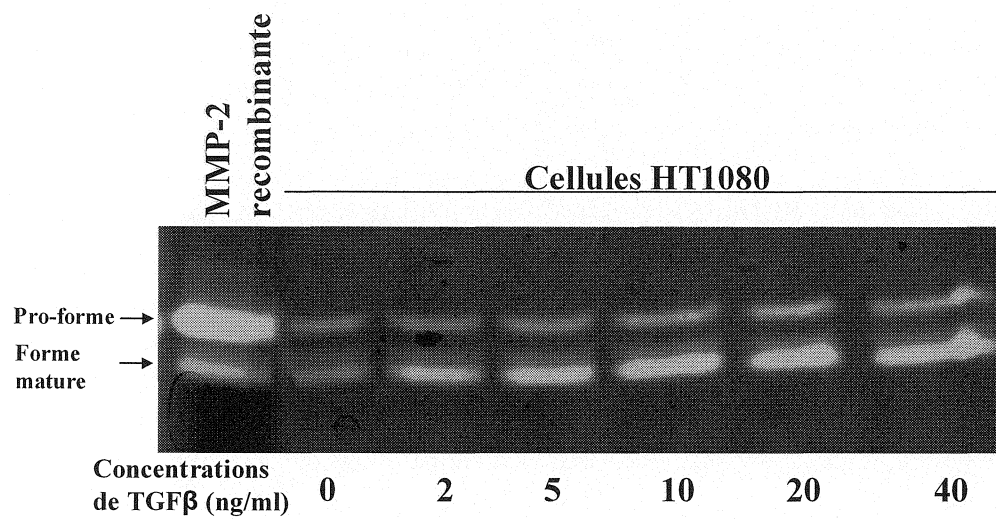


Figure 17 : Impact du TGFβ sur la production de MMP-2 active. La production de MMP-2 par les cellules HT1080 a été observée par zymographie. Les cellules ont été stimulées avec des concentrations croissantes de TGFβ et avec 30 µg/ml de concanavaline A pendant 16 heures. L'effet stimuloire du TGFβ a été observé lors des deux expériences indépendantes effectuées.

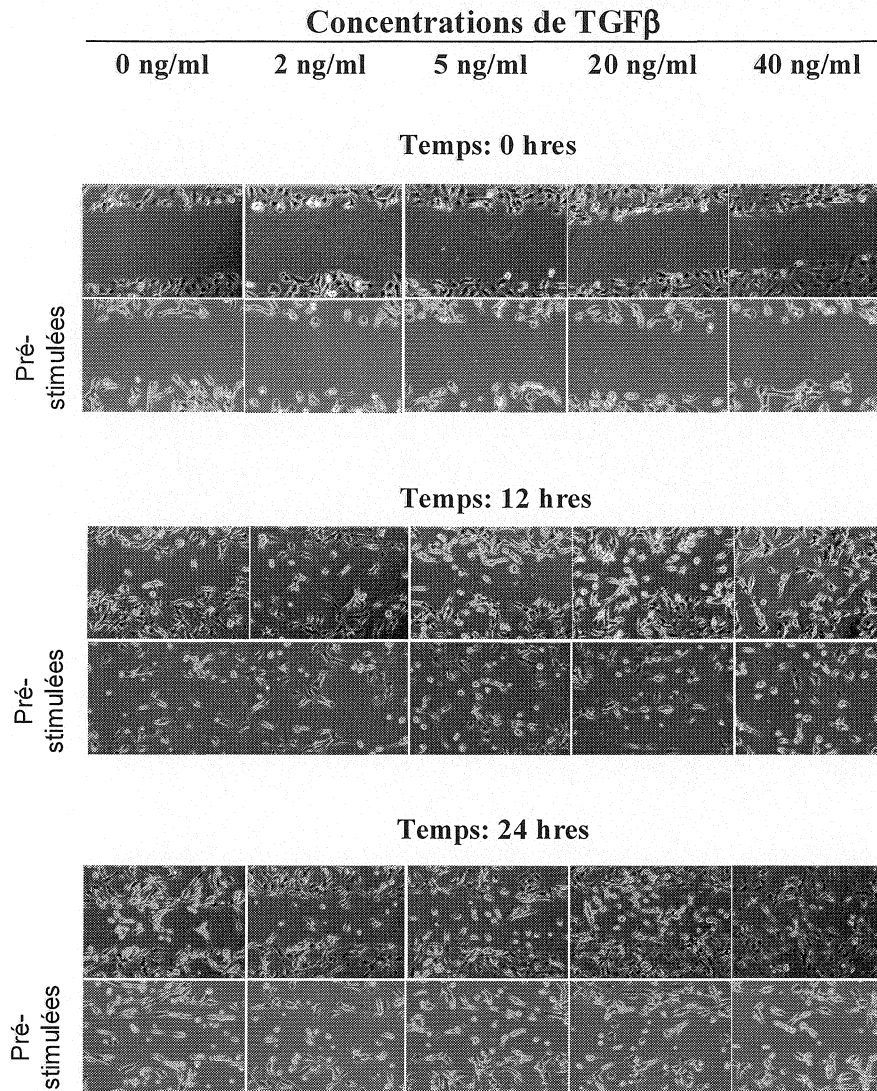


Figure 18 : Impact du TGF β sur la motilité des cellules HT1080. Les deux essais de motilité se sont déroulés sur une période de 16 heures. Les cellules ont été stimulées avec des concentrations croissantes de TGF β pendant la durée de l'expérience et, lorsqu'indiqué, elles ont été préstimulées 16 heures avant la formation de la blessure. La micrographie présentée pour chaque temps constitue un champ représentatif sur 5. L'effet d'une stimulation avec 2 ng/ml de TGF β a été confirmé dans une deuxième expérience effectuée selon des conditions identiques. Les micrographies ont été prises à un grossissement de 160 X.

Il est à noter qu'en présence ou en absence de préstimulation au TGF β , les cellules ont été stimulées lors du 24 heures d'observation expérimentale avec des concentrations croissantes de cette cytokine. À la figure 18, on remarque que, de façon générale, le TGF β augmente la motilité des cellules HT1080. De plus, le temps de stimulation semble influencer les effets observés.

En effet, lorsque les cellules sont préstimulées avec des concentrations croissantes de TGF β 16 heures avant l'essai, bien que l'on retrouve des effets stimulateurs du TGF β sur la motilité, ces derniers sont beaucoup plus faibles et moins perceptibles qu'en absence de préstimulation. On peut donc supposer que le TGF β induit la motilité cellulaire pendant un certain laps de temps, mais qu'une stimulation prolongée entraîne progressivement une diminution de cette induction.

L'ensemble de ces résultats permet de conclure que les cellules HT1080 répondent au TGF β dans les événements associés à la progression tumorale. Ces cellules constituent donc un modèle pertinent à la suite de l'étude.

3.2 Caractérisation des transfectants stables

Afin d'étudier le rôle de la maturation du TGF β par la furine dans la tumorigénèse, des transfectants stables de cellules HT1080 ont été générés. Plusieurs *pools* cellulaires ont été créés pour la plupart d'entre eux, soit des transfectants stables pour :

1. le vecteur vide pcDNA3.1 qui sert de contrôle dans l'étude ;
2. le pcDNA3.1 encodant la forme sauvage du TGF β (CMV-TGF β) ;
3. le pcDNA3.1 qui exprime la forme mutée du TGF β au site de clivage par la furine (CMV-TGF $\beta^{275\text{AHRA}278}$ /CMV-TGF β muté) ;
4. le vecteur pcDNA3.1/Hygro qui exprime le PDX, un inhibiteur de la furine (CMV-PDX) ;
5. une combinaison de vecteurs qui expriment le PDX ou la forme constitutivement active du récepteur T β R-I (CMV-PDX/T β R-I^{T204D}) ;
6. le pcDNA3.1 qui code pour la forme sauvage du récepteur T β R-I (T β R-Iwt) ;
7. le pcDNA3.1 qui exprime la forme constitutivement active du récepteur T β R-I (T β R-I^{T204D}).

3.2.1 Expression et fonctionnalité des transgènes

Avant d'utiliser les transfectants stables, nous voulions nous assurer qu'ils expriment les transgènes d'intérêt. Cette expression a été vérifiée par immunobuvardage de type Western. Tel que présenté à la figure 19, les transfectants stables pour la forme sauvage ou la forme mutée du TGF β au site de clivage par la furine surexpriment des niveaux similaires de TGF β (figure 19a). De plus, l'expression du TGF β des surnageants cellulaires de ces transfectants démontre que celui-ci n'est mûré que chez les CMV-TGF β tel que démontré par l'apparition d'une bande correspondant au LAP, soit le peptide dénudé de la portion c-terminale mature du TGF β (figure 19b). Les transgènes

codant pour la forme sauvage ou la forme constitutivement active du T β R-I possèdent l'étiquette HA. Ceci nous a permis de détecter l'expression de ces derniers chez les transfectants stables. On remarque à la figure 19c que les récepteurs de type sauvage ou constitutivement actif sont exprimés de façon similaire chez ces transfectants stables. Enfin, le transgène codant pour le PDX porte l'étiquette 6-His ce qui nous a permis de s'assurer que le PDX est exprimé de façon comparable chez les CMV-PDX et les CMV-PDX/T β R-I^{T204D} (figure 19d). Cette expression a été reconfirmée par un immunobuvardage de type Western utilisant un antisérum contre l' α_1 -antitrypsine (résultat non présenté).

Afin de vérifier la fonctionnalité des transgènes, nous avons évalué par un essai ELISA la production de TGF β bioactif par les transfectants stables. Tel qu'illustré à la figure 20, les CMV-TGF β sécrètent environ cinq fois plus de TGF β bioactif que les cellules contrôles. De plus, les CMV-PDX, les T β R-Iwt, les T β R-I^{T204D} et les CMV-PDX/ T β R-I^{T204D} sécrètent des concentrations de TGF β bioactif similaires à celles des cellules contrôles. Enfin, les CMV-TGF β ^{275AHRA278} sécrètent 50% moins de TGF β bioactif que les cellules contrôles. Les différents transfectants produisent donc des concentrations de TGF β bioactif qui varient en fonction des transgènes impliqués.

Étant donné qu'une grande proportion des réponses au TGF β est médiée par la voie des Smads (Levy et Hill, 2005), nous avons vérifié l'intégrité de cette voie de transduction du signal pour chacun des transfectants.

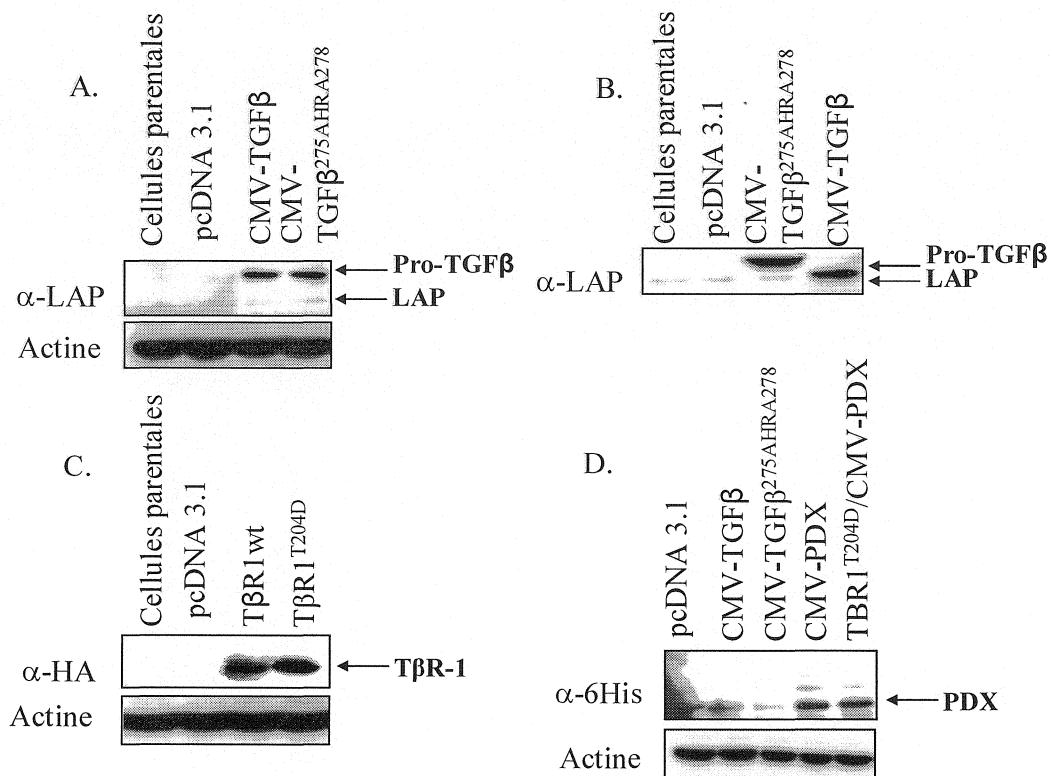


Figure 19 : Expression des transgènes chez les transfectants stables. L'expression des transgènes a été vérifiée par immunobuvardage de type Western chez tous les *pools* de chaque transfectant stable. Ces résultats représentent l'expression des transgènes d'un *pool* représentatif de chaque transfectants stables. (A) Expression du TGFβ dans les lysats protéiques de cellules permettant de détecter la forme précurseure du TGFβ. (B) Expression du TGFβ dans les surnageants cellulaires permettant de détecter la forme précurseure et la forme mature du TGFβ. (C) Expression du récepteur TβR-I dans les lysats protéiques. (D) Expression du PDX dans les lysats protéiques. Les résultats sont représentatifs de trois expériences distinctes.

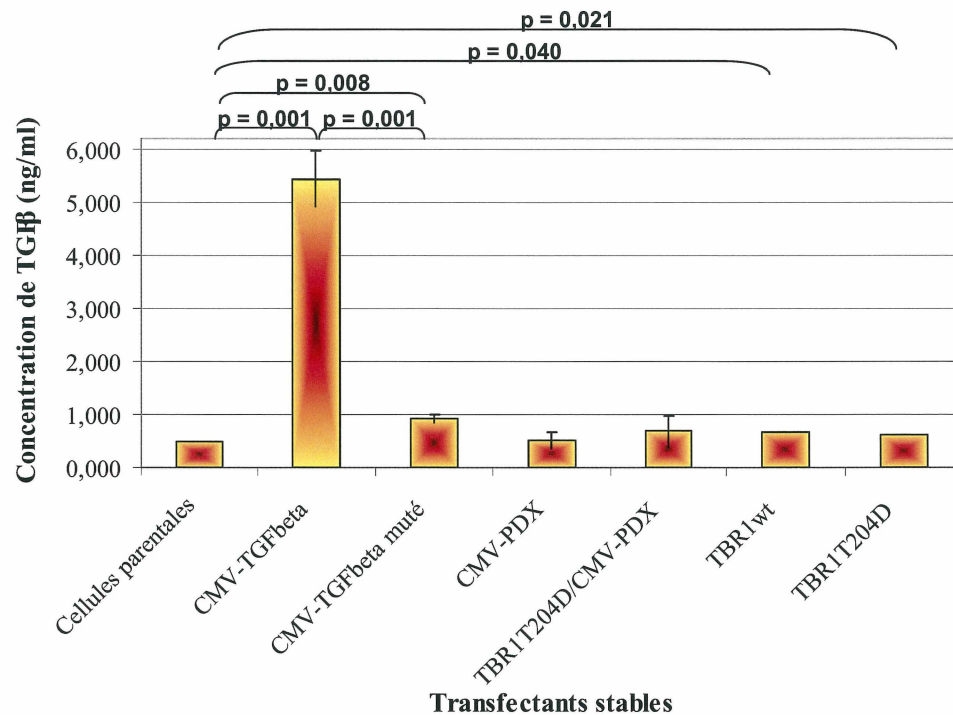


Figure 20 : Production de TGFβ bioactif par les transfectants stables. Les concentrations de TGFβ bioactif ont été mesurées par ELISA. Les cellules ont été sevrées à 0,1% de sérum 18 heures avant l'essai. La moyenne obtenue pour les différents *pools* de chaque transfectant stable est présentée. Les résultats sont représentatifs de deux expériences. Les résultats statistiques présentés ont été obtenus à l'aide du test de Student. La différence significative entre les cellules contrôles et les CMV-TGFβ a été reconfirmée à l'aide du test ANOVA ($p = 0,014$).

Pour ce faire, des immunobuvardages de type Western pour la forme phosphorylée de Smad2 ont été réalisés ainsi que des marquages en immunofluorescence pour ce même facteur de transcription et pour le second R-Smad principal, soit le Smad3. À la figure 21, on remarque une augmentation de la forme phosphorylée de Smad2 chez les transfectants CMV-TGF β et T β R-1^{T204D}. Par ailleurs, cette augmentation n'est pas retrouvée chez les CMV-TGF β ^{275AHRA278} qui expriment un taux de Smad2 phosphorylé similaire à celui des cellules contrôles. De plus, on remarque que les niveaux de la forme phosphorylée de Smad2 détectés chez les CMV-PDX sont inférieurs à ceux des cellules contrôles et que ces niveaux sont rétablis lorsque la forme constitutivement active du récepteur de type I est coexprimée avec le PDX tel que démontré avec les transfectants stables CMV-PDX/T β R-1^{T204D}. On peut également constater à la figure 22 que la forme phosphorylée de Smad2 et le Smad3 se retrouvent au noyau chez CMV-TGF β et T β R-1^{T204D} de façon basale, alors que chez tous les autres transfectants stables on ne les retrouve dans ce compartiment cellulaire qu'à la suite d'une stimulation au TGF β . Ces résultats démontrent que la voie des Smads est modulable chez tous les transfectants et qu'elle est activée de façon basale chez les CMV-TGF β et les T β R-1^{T204D}.

3.2.2 Induction de gènes cibles du TGF β

Le TGF β est un inducteur d'une variété de gènes impliqués dans la progression tumorale incluant le PAI-1 (Keeton et al, 1991), la furine (Blanchette et al, 2001b), le VEGF

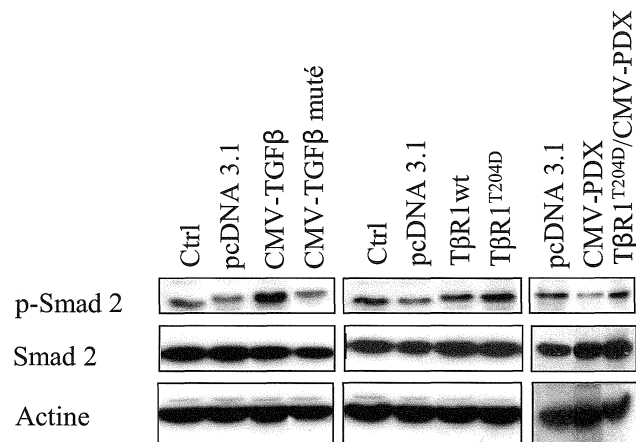


Figure 21 : Expression de la forme phosphorylée de Smad2. La fonctionnalité de la voie des Smads chez les transfectants stables a été évaluée selon l'expression de la forme phosphorylée de Smad2. Les cellules ont été sévrées 16 heures avant les essais et, lorsqu'indiqué, stimulées avec 5 ng/ml de TGFβ. Le niveau d'expression de la forme phosphorylée de Smad2 a été détecté par immunobuvardage de type Western. Les résultats d'une expérience représentative, extraite d'un total de deux expériences, sont présentés.

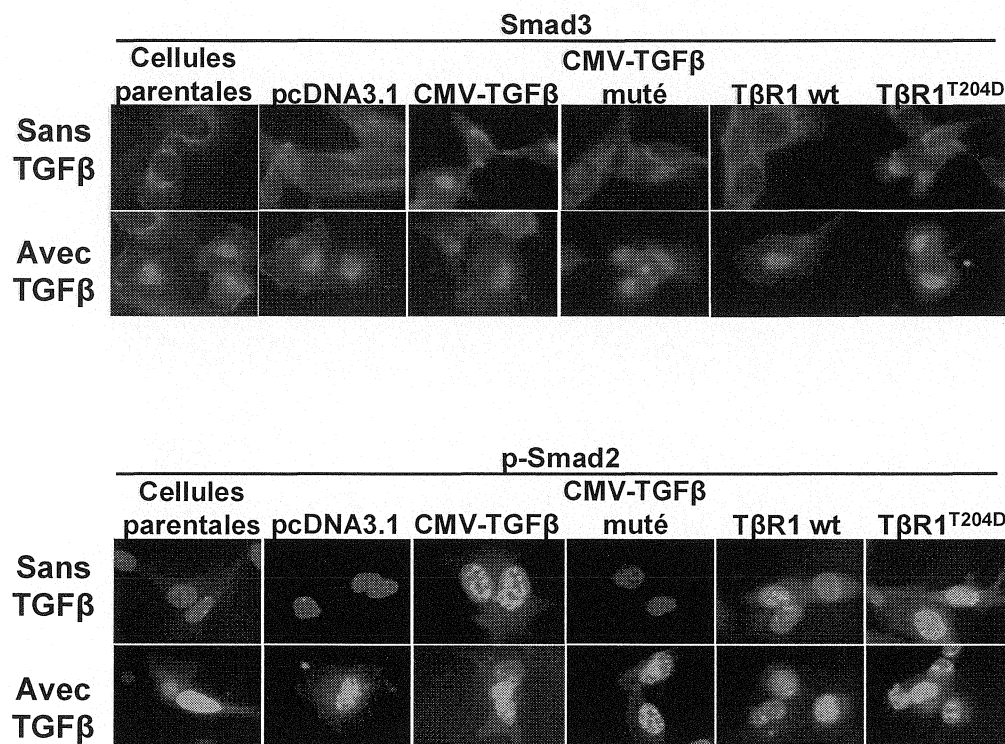


Figure 22 : Localisation cellulaire des principaux R-Smads chez les transfectants stables. La fonctionnalité de la voie des Smads chez les transfectants stables a été évaluée selon la localisation cellulaire de Smad3 et de la forme phosphorylée de Smad2. Les cellules ont été sévrées 16 heures avant les essais et, lorsqu'indiqué, stimulées avec 5 ng/ml de TGFβ. La localisation de Smad3 et de la forme phosphorylée de Smad2 a été observée par immunofluorescence. Les résultats obtenus pour un des *pools* de chaque transfectant stable sont présentés. La micrographie présentée pour chaque transfectant stable constitue un champ représentatif de dix champs aléatoires. Les micrographies ont été prises à un grossissement de 1000 X.

(Teraoka et al, 2001) et la MT1-MMP (Stawowy et al, 2004). On observe une surexpression de ces gènes chez CMV-TGF β tel que présentée à la figure 23. Les niveaux d'expression des quatre gènes étudiés sont similaires chez les cellules contrôles et les CMV-TGF $\beta^{275\text{AHRA}278}$. Ces résultats indiquent que la réponse des gènes induits par le TGF β est plus forte chez les CMV-TGF β que chez les autres transfectants stables qui sécrètent des concentrations inférieures de TGF β bioactif.

L'ensemble de ces résultats suggère que les transfectants stables sont fonctionnels et qu'ils exercent les rôles attendus pour chacun tels que présentés au tableau V. Ils seront donc utilisés afin d'étudier le rôle de la maturation du TGF β par la furine dans la tumorigénèse.

3.3 Impact de la maturation du TGF β par la furine dans la tumorigénèse

3.3.1 La prolifération

3.3.1.1 Modèle cellulaire *in vitro*

La capacité de prolifération des différents transfectants stables a été évaluée par incorporation de thymidine tritiée. Tel que présenté à la figure 24, les *pools* CMV-TGF β prolifèrent davantage que les *pools* de cellules contrôles. On constate également que la prolifération des cellules transfectées au CMV-TGF $\beta^{275\text{AHRA}278}$ n'est que légèrement inférieure à celle des CMV-TGF β .

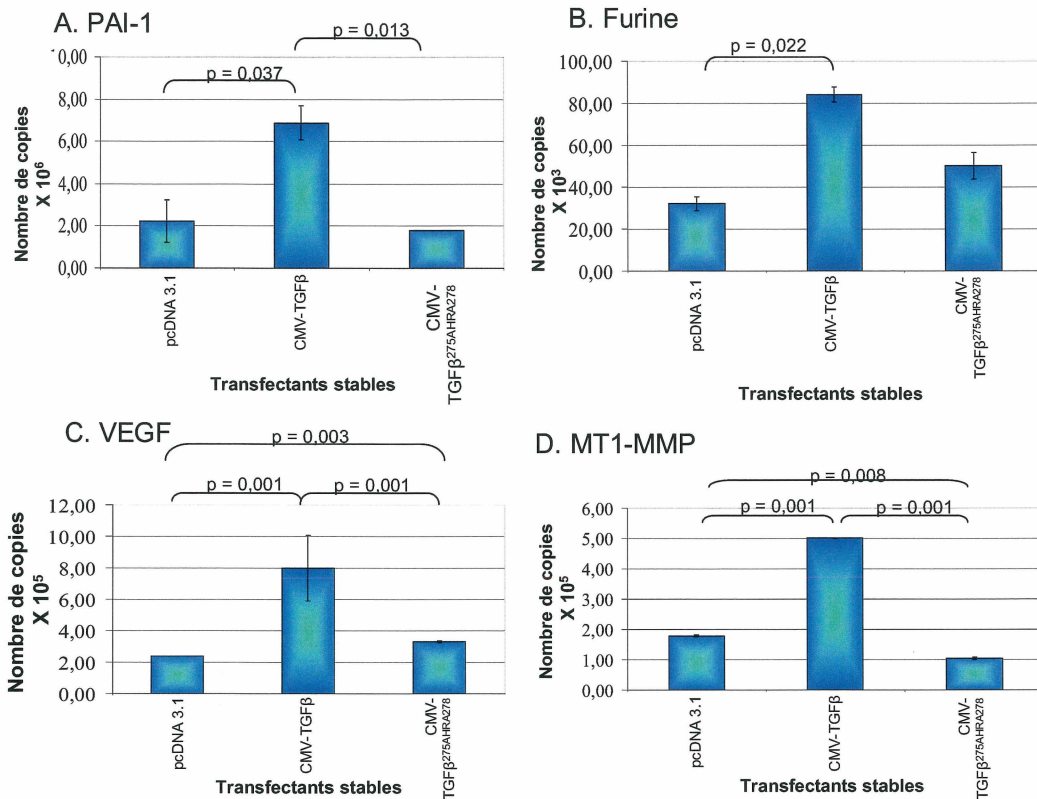


Figure 23 : Induction de gènes cibles du TGFβ. Le niveau d'expression de quatre gènes cibles du TGFβ a été évalué par PCR quantitatif en temps réel. Les cellules ont été sevrées 16 heures avant l'essai. Les expériences ont été conduites en duplicata. Chaque graphique représente une expérience représentative. Les résultats obtenus ont été confirmés lors de quatre autres expériences effectuées selon des conditions identiques. Les données statistiques présentées ont été obtenues à l'aide du test de Student. Les écarts significatifs entre les groupes ont tous été reconfirmés par le test d'ANOVA avec les valeurs de p suivantes : (A) PAI-1. p = 0,011 (B) Furine. p = 0,003 (C) VEGF. p = 0,001 (D) MT1-MMP. p = 0,001.

Ceci peut s'expliquer par le fait que le CMV-TGF β sécrète au-delà de cinq fois plus de TGF β que les cellules contrôles alors que la sécrétion de TGF β bioactif par le CMV-TGF $\beta^{275\text{AHRA}278}$ n'est que deux fois supérieure à celle des cellules contrôles. Or, le TGF β augmente la prolifération qu'à de faibles concentrations. Il a un effet stimulateur beaucoup plus modéré et même nul à de plus fortes concentrations.

En l'absence de maturation des substrats de la furine, la prolifération est réduite tel que démontré chez les *pools* CMV-PDX. Par contre, chez les transfectants stables CMV-PDX/T β R-1^{T204D}, la capacité de prolifération est rétablie pour atteindre des niveaux comparables à ceux des cellules contrôles, ce qui souligne l'implication de la maturation du TGF β dans l'induction de la prolifération par la furine. On peut donc conclure que le TGF β est responsable de l'effet de la furine sur la prolifération cellulaire.

3.3.1.2 Modèle de progression tumorale *in vivo*

Afin d'étudier le rôle de la maturation du TGF β par la furine dans le développement du cancer *in vivo*, un modèle de progression tumorale chez des souris nu/nu a été utilisé. Différents transfectants stables ont été injectés de façon sous-cutanée chez ces souris et le développement des tumeurs a été observé en fonction du temps.

3.3.1.2.1 La croissance tumorale

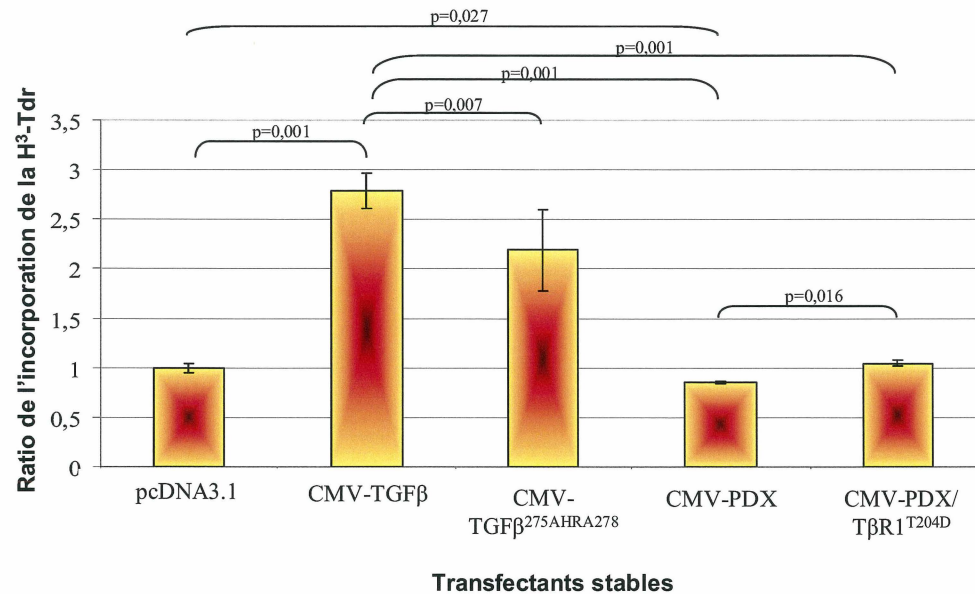


Figure 24 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine sur la prolifération des cellules. La capacité de prolifération des transfectants stables a été étudiée par incorporation de thymidine tritiée. Les cellules ont été sevrées 16 heures avant l'incorporation de thymidine qui s'est étendue sur 8 heures. Le graphique présente les résultats obtenus en duplicata lors de deux expériences représentatives pour un *pool* de chaque transfectant stable. Les résultats ont été confirmés par une autre expérience effectuée dans les mêmes conditions. Les données statistiques ont été calculées à partir du test de Student. La différence significative entre les cellules contrôles et les CMV-TGFβ a été reconfirmée par le test d'ANOVA (p = 0,013).

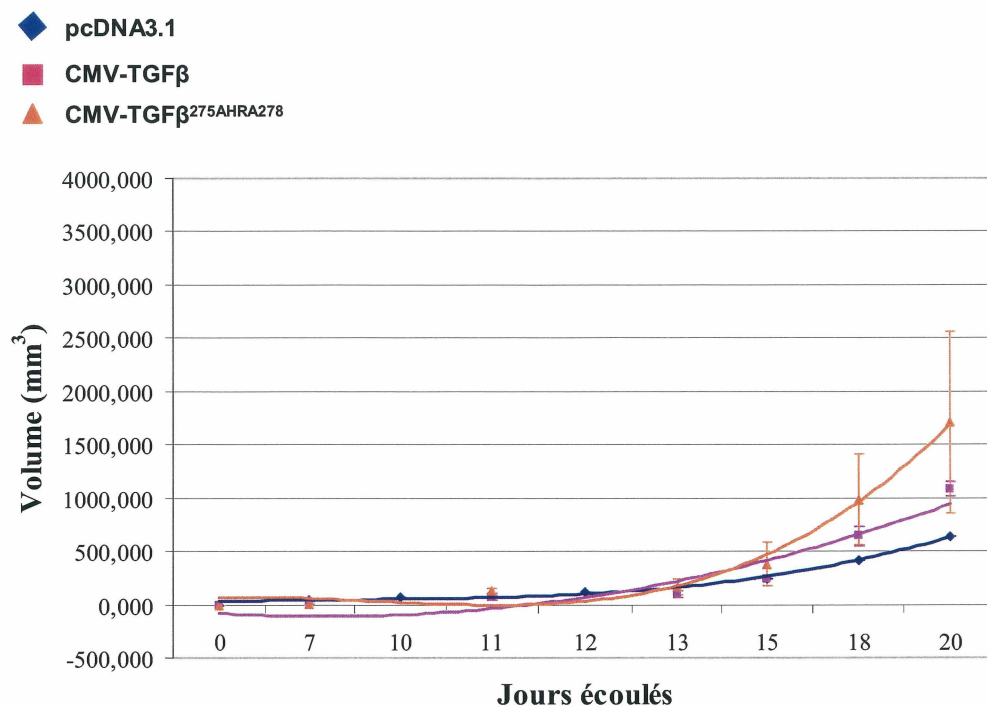


Figure 25 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine sur la progression tumorale. Deux souris ont été injectées en quatre points sur le dos pour chaque *pool* de transfectants stables. Deux *pools* ont été utilisés pour chaque transfectants stables. Les tumeurs issues de ces injections ont été mesurées régulièrement sur une période de 20 jours. Le graphique présente les résultats obtenus pour toutes les tumeurs issues d'un *pool* de chaque transfectant stable.

Les transfectants stables ont été injectés en quatre points sur le dos des souris et les tumeurs résultantes ont été mesurées à différents temps afin d'en évaluer la croissance. On remarque à la figure 25 que la croissance des tumeurs dérivées de l'injection des CMV-TGFβ^{275AHRA278} est augmentée par rapport à celle des tumeurs résultant de l'injection des cellules contrôles et des CMV-TGFβ. L'effet stimulateur du TGFβ sur la prolifération des cellules HT1080 semble donc être inhibé à de fortes doses.

Chez les transfectants stables pour le TGFβ de type sauvage, la maturation du TGFβ par la furine semble donc avoir un rôle protecteur sur le développement tumoral *in vivo*, puisqu'en absence de celle-ci la croissance des tumeurs est augmentée.

3.3.1.2.2 Expression des transgènes et activation de la voie des Smads chez les tumeurs

Afin de s'assurer que les effets observés sur la croissance tumorale sont bien imputables à la présence des transgènes, l'expression de ceux-ci a été vérifiée chez chaque tumeur par immunobuvardage de type Western. Tel que démontré à la figure 26, l'expression de TGFβ est augmentée chez les tumeurs issues de l'injection des CMV-TGFβ et des CMV-TGFβ^{275AHRA278}.

Afin de s'assurer de la fonctionnalité des transgènes chez les tumeurs, nous avons vérifié l'expression de la forme phosphorylée de Smad2 chez chaque tumeur par immunobuvardage de type Western.

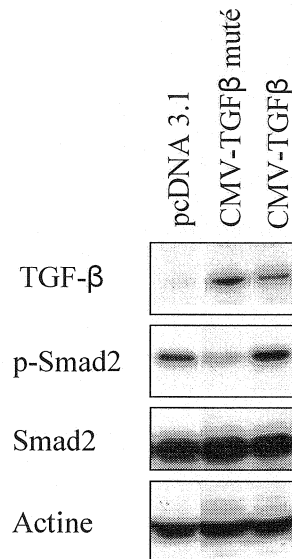


Figure 26 : Expression du TGFβ et fonctionnalité de la voie des Smads dans les tumeurs. L'expression du TGFβ et de la forme phosphorylée de Smad2 a été vérifiée par immunobuvardage de type Western. Ces expressions ont été observées dans 4 tumeurs pour chaque *pool* de transfectants stables. Cette figure présente le résultat obtenu pour une tumeur de chaque transfectant stable. L'expression de Smad2 et de l'actine a été vérifiée à titre de contrôle.

On observe à la figure 26 une plus forte expression de la forme phosphorylée de Smad2 chez les tumeurs issues de l'injection de CMV-TGF β comparativement à celle obtenue chez les tumeurs résultant de l'injection des cellules contrôles. De plus, on remarque une faible expression de la forme phosphorylée de Smad2 chez les tumeurs provenant de l'injection de CMV-TGF $\beta^{275\text{AHRA}278}$. Ceci démontre que la voie des Smads est plus fortement activée chez les tumeurs issues de l'injection de CMV-TGF β que chez les cellules contrôles alors qu'elle est presque inactive chez les tumeurs issues de l'injection des CMV-TGF $\beta^{275\text{AHRA}278}$. Ces résultats confirment que les transgènes, en plus d'être exprimés chez les tumeurs, sont fonctionnels.

3.3.2 La dédifférenciation

Une fois la tumeur formée, les cellules passent par un processus de dédifférenciation appelé EMT (*Epithelial to Mesenchymal Transition*) afin de développer la capacité d'interagir avec un nouvel environnement (Huber et al, 2005). La seconde étape de l'étude est donc de déterminer l'impact de la maturation du TGF β par la furine dans la dédifférenciation des cellules tumorales. Pour ce faire, l'organisation de l'actine, l'expression de la vimentine et la présence de cadhérines aux jonctions intercellulaires ont été observées par immunofluorescence chez les différents transfectants stables. Les cellules ont été sevrées à 0,1% de sérum et stimulées avec 5 ng/ml de TGF β 16 heures avant le début du marquage. Tel qu'illustré à la figure 27, chez les CMV-TGF β , les T β R-Iwt et les T β R-I^{T204D}, l'actine se localise majoritairement au cytoplasme où elle se

présente sous la forme de filaments organisés. Par contre, chez les autres transfectants stables, dont les CMV-TGF β ^{275AHRA278} et les cellules contrôles, l'actine se situe principalement aux jonctions intercellulaires où elle se présente sous une forme désorganisée.

À la suite d'une stimulation au TGF β de CMV-TGF β , de T β R-Iwt et de T β R-I^{T204D}, on n'observe aucune modification de l'organisation ou de la localisation de l'actine. Les cellules contrôles et les CMV-TGF β ^{275AHRA278}, une fois stimulées, présentent une organisation de l'actine en filaments au niveau du cytoplasme. Le TGF β semble donc important pour l'organisation de l'actine en fibres de stress chez les cellules HT1080.

À la figure 27, on observe aussi le niveau d'expression du marqueur de dédifférenciation vimentine. Cette protéine est exprimée chez les cellules de type mésenchymal (Zavadi et Böttinger, 2005). On remarque une faible expression de la vimentine chez les CMV-TGF β , les T β R-Iwt et les T β R-I^{T204D} comparativement à ce que l'on retrouve chez les cellules contrôles et le CMV-TGF β ^{275AHRA278}. De plus, une stimulation des CMV-TGF β ^{275AHRA278} avec 5 ng/ml de TGF β réduit l'expression de vimentine à des niveaux comparables aux CMV-TGF β . Cette même stimulation n'a aucun effet sur le niveau d'expression de la vimentine chez les CMV-TGF β , les T β R-Iwt et les T β R-I^{T204D}. Le TGF β semble donc être un inhibiteur de la dédifférenciation chez les cellules HT1080.

Enfin, la présence de cadhérines aux jonctions intercellulaires chez les différents transfectants stables est montrée à la figure 27.

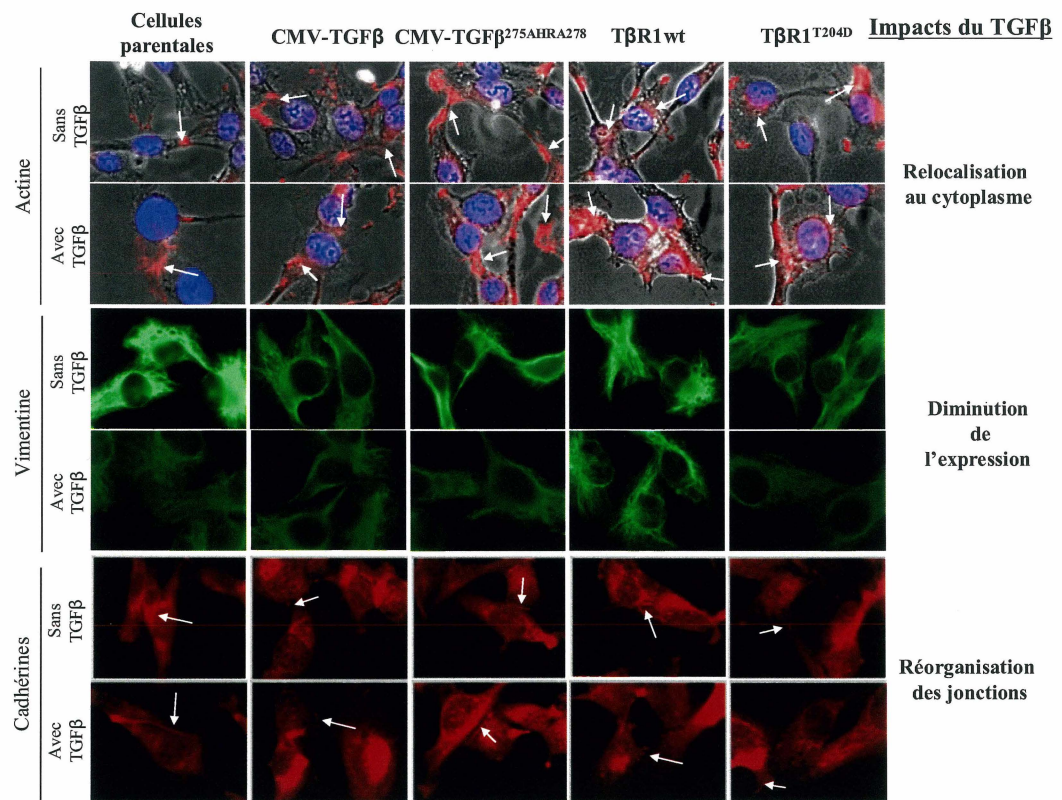


Figure 27 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine sur la différenciation

des cellules. Le niveau de différenciation des cellules a été étudié par un marquage en immunofluorescence de l'actine, de la vimentine et des cadhérines. Les cellules ont été sévrées et, lorsqu'indiqué, stimulées avec 5 ng/ml de TGFβ 16 heures avant le marquage. Les micrographies présentées constituent un champ représentatif de 10 champs aléatoires. Les micrographies ont été prises à un grossissement de 1000 X. Celles présentant l'organisation de l'actine constituent une superposition des cellules dans le visible (gris), des noyaux marqués au Dapi (bleu) et de l'actine marquée par immunofluorescence indirecte (rouge). Les résultats ont été confirmés lors de deux autres expériences effectuées selon des conditions expérimentales similaires.

On remarque qu'il y a présence de cadhérines aux jonctions intercellulaires de tous les transfectants stables et ce, en présence ou en absence d'une stimulation au TGF β . Par contre, l'organisation des cadhérines au niveau de ces jonctions diffère d'un transfectant à l'autre et selon la stimulation. En effet, les jonctions intercellulaires sont moins bien définies chez les CMV-TGF β , les T β R-Iwt et les T β R-I^{T204D} que chez les cellules contrôles et les CMV-TGF β ^{275AHRA278} en absence de stimulation. De plus, une stimulation au TGF β de tous les transfectants stables rend les jonctions intercellulaires encore moins définies. Le TGF β semble donc induire une désorganisation des jonctions intercellulaires.

Ces résultats suggèrent que la maturation du TGF β par la furine n'est pas vraiment impliquée dans la dédifférenciation des cellules tumorales. Par contre, elle joue un rôle dans l'organisation du cytosquelette et inhibe la définition des jonctions intercellulaires. Ces deux facteurs peuvent favoriser l'invasion cellulaire dans les étapes subséquentes de la tumorigénèse.

3.3.3 L'invasion cellulaire

Afin de former des métastases, les cellules tumorales doivent développer la capacité de migrer à travers les tissus environnants. L'invasion cellulaire est donc une étape clé dans la progression tumorale.

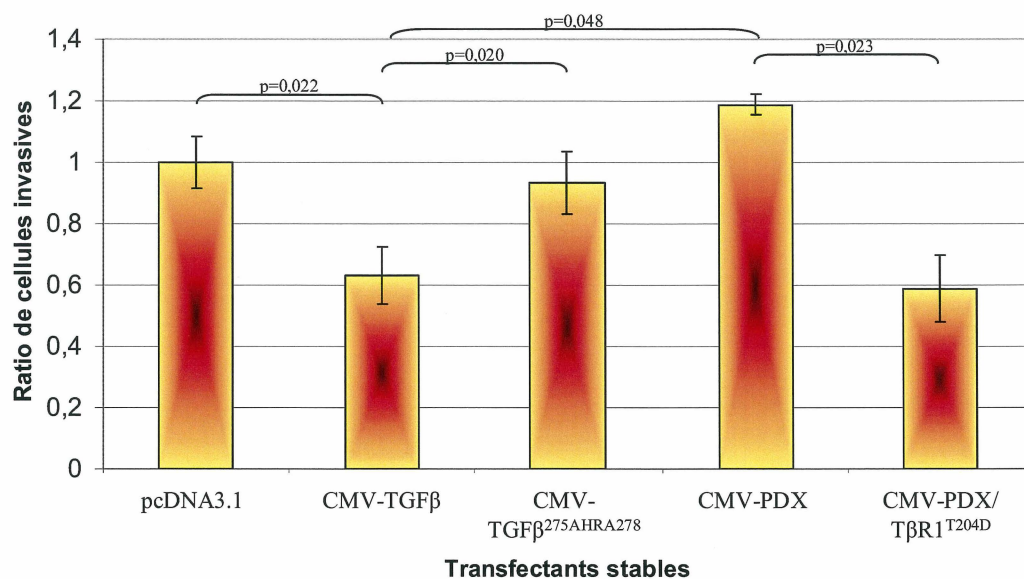


Figure 28 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine sur la capacité d'invasion des cellules. Les essais d'invasion ont été effectués dans des chambres de Boyden sur une période de 7 heures. Une matrice de collagène de type IV à une concentration de 100 µg/ml a été utilisée. Le graphique représente les résultats obtenus dans deux expériences représentatives conduites en duplicata. Ces résultats ont été confirmés dans au moins deux autres expériences exécutées dans les mêmes conditions expérimentales. Les résultats statistiques présentés sur le graphique ont été calculés à partir du test de Student. Les écarts significatifs ont tous été reconfirmés à l'aide du test d'ANOVA ($p = 0,001$).

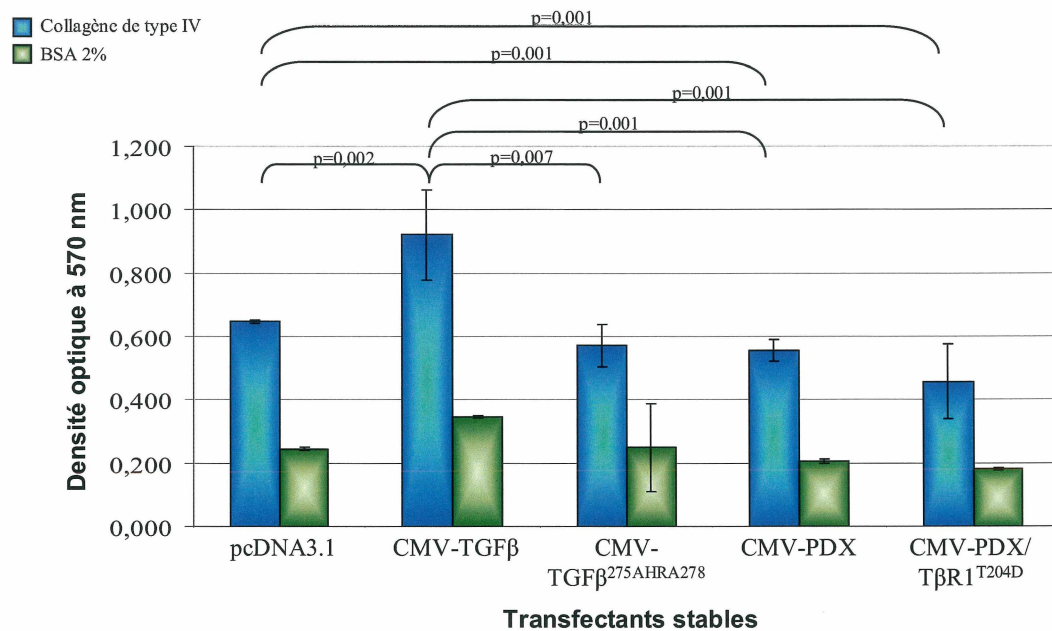


Figure 29 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine sur la capacité d'adhésion des cellules. L'essai d'adhésion a été effectué sur une matrice de collagène de type IV à une concentration de 100 µg/ml sur une période de 2 heures. L'essai a été réalisé en triplicata. Le graphique présente les résultats obtenus pour un *pool* de chaque transfectant stable lors d'une expérience représentative. Les résultats ont été confirmés lors d'une seconde expérience menée dans des conditions similaires. Les données statistiques présentées découlent du test de Student. La différence significative entre les CMV-TGFβ et les CMV-PDX/TβR-1^{T204D} a été confirmée par un test d'ANOVA ($p = 0,017$).

Afin d'étudier l'impact de la maturation du TGF β par la furine dans ce processus, les transfectants stables ont été utilisés dans un essai d'invasion cellulaire de 7 heures dans des chambres de Boyden sur une matrice de collagène de type IV.

La figure 28 présente les résultats obtenus en invasion cellulaire pour les différents transfectants stables. On remarque que les CMV-TGF β ont une capacité d'invasion réduite par rapport aux cellules contrôles et aux CMV-TGF $\beta^{275\text{AHRA}278}$. On constate également une hausse de la capacité d'invasion chez les CMV-PDX. On peut noter que cette augmentation de l'invasion chez les CMV-PDX est absente chez les CMV-PDX/T β R-I^{T204D}, mutation qui reconstitue la signalisation cellulaire associée au TGF β . On pourrait donc penser que le TGF β endogène inhibe le caractère invasif des cellules tumorales. De plus, le TGF β est responsable des effets de la furine sur l'invasion cellulaire.

3.3.3.1 L'adhésion

Tel que mentionné précédemment, dans le processus de migration à travers les tissus, les cellules doivent tout d'abord adhérer à la matrice extracellulaire (Albini et al, 2004). Afin de vérifier l'impact de la maturation du TGF β par la furine sur ce phénomène, les transfectants stables ont été soumis à un essai d'adhésion cellulaire sur une matrice de collagène de type IV. À la figure 29, on observe que la capacité d'adhésion des transfectants stables à une matrice de collagène de type IV est similaire pour les CMV-

TGF β ^{275AHRA278} et les cellules contrôles alors qu'elle est significativement augmentée chez les CMV-TGF β par rapport aux cellules contrôles et diminuée chez les transfectants stables contenant le CMV-PDX par rapport aux cellules contrôles. Le TGF β et la furine permettent donc chacun une meilleure interaction avec ce constituant de la matrice extracellulaire. Par contre, la coexpression du récepteur de type I constitutivement actif et du CMV-PDX ne rétablit pas la capacité d'adhésion des cellules. Par conséquent, bien que les deux protéines augmentent l'adhésion cellulaire, le TGF β n'est pas responsable de l'effet de la furine dans ce processus. Ceci suggère que les deux acteurs utilisent des mécanismes différents dans ce contexte. L'invasion cellulaire nécessite aussi la capacité de dégrader la matrice extracellulaire, entre autres par la production de métalloprotéases.

3.3.3.2 La production de MMP-2

La capacité des transfectants stables à produire de la MMP-2 a été observée par zymographie. La figure 30 démontre une production de la pro-forme de la MMP-2 (forme inactive) équivalente chez tous les transfectants stables. On observe également une bande additionnelle correspondant à la MMP-2 active chez tous les transfectants stables alors qu'elle est absente chez le contrôle. La production de MMP-2 active est toutefois plus importante chez les CMV-TGF β et les CMV-PDX/T β R-1^{T204D} que chez les autres transfectants stables et les cellules contrôles. En fait, la production de MMP-2 active est presque abolie chez CMV-TGF β ^{275AHRA278} et CMV-PDX.

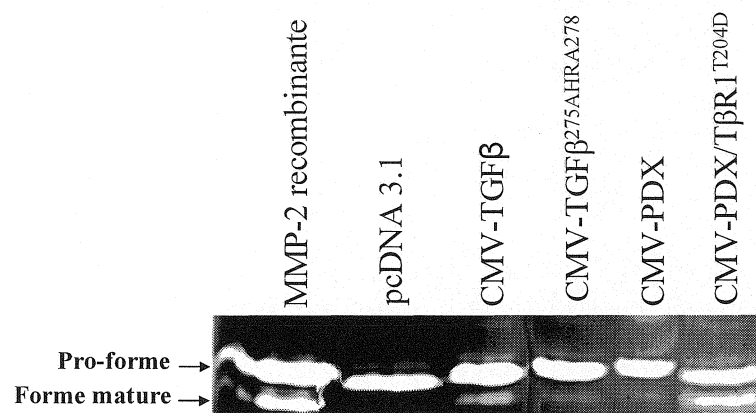


Figure 30 : Impact de la maturation du TGF β par la furine sur la production de MMP-2. La production de MMP-2 a été observée par zymographie. Les cellules ont été sevrées 16 heures avant l'essai. Les résultats obtenus ont été confirmés dans trois autres expériences effectuées dans les mêmes conditions.

Le TGF β et la furine semblent donc favoriser l'activation de la MMP-2. De plus, l'expression conjointe du récepteur de type I constitutivement actif et du CMV-PDX entraîne un rétablissement de la production de MMP-2 active. Ces résultats nous permettent de conclure que le TGF β est responsable de l'effet de la furine sur la production de MMP-2 active.

3.3.3.3 La formation d'invadopodes

La production de MMP-2 corrèle souvent avec la formation d'invadopodes, des prolongements du cytoplasme riches en actine et en métalloprotéases que l'on retrouve chez les cellules cancéreuses (Chen et Wang, 1999).

La formation d'invadopodes par les transfectants stables a donc été évaluée. Brièvement, les cellules ont étéensemencées sur une matrice de gélatine couplée à un fluorophore et les zones de dégradation ont été observées. À la figure 31A, on retrouve un schéma illustrant la structure des invadopodes. Concrètement, il se forme des prolongements cytoplasmiques au niveau de la membrane de la cellule invasive. Ces prolongements sont riches en actine (Baldassarre et al, 2006) et on retrouve une forte concentration de métalloprotéases à la surface membranaires de ceux-ci (Nakahara et al, 1997). Ceci explique qu'on observe une zone de dégradation de la matrice colocalisant avec des régions riches en actine chez les cellules aux pourtours des prolongements.

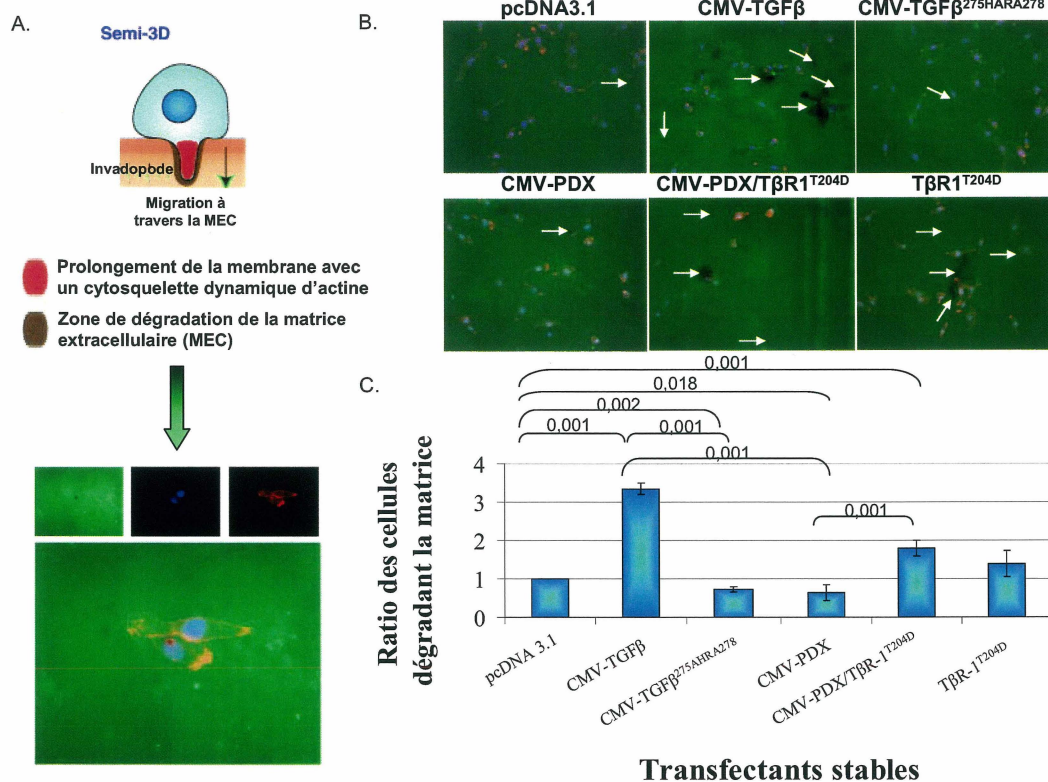


Figure 31 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine sur la formation d'invadopodes. Les cellules ont été cultivées sur une matrice de gélatine couplée à un fluorophore pendant 10 heures. La formation de zones de dégradation a été observée. Les micrographies présentent la gélatine (vert), l'actine marquée à la phalloïdine (rouge) et les noyaux marqués au Dapi (bleu). (A) Schématisation de la structure des invadopodes et exemple type d'un invadopode chez les cellules HT1080. Les micrographies ont été prises à un grossissement de 400 X. (B) Formation d'invadopodes. Les micrographies ont été prises à un grossissement de 100 X. Les flèches blanches pointent les principales zones de dégradation. (C) Quantification des cellules dégradant la matrice de gélatine. Le graphique constitue la combinaison de trois expériences indépendantes réalisées dans les mêmes conditions. Les données statistiques ont été obtenues à l'aide du test de Student. Les écarts significatifs entre les groupes ont tous été reconfirmés à l'aide d'un test d'ANOVA ($p \leq 0,001$).

À la figure 31B, on remarque que la formation d'invadopodes varie d'un transfectant à l'autre tant au niveau de la quantité d'invadopodes formés qu'au niveau de la forme et de la taille de ces derniers. À la figure 31C, on retrouve un graphique révélant la proportion des cellules produisant des invadopodes pour chaque transfectants. Cette proportion a été déterminée en faisant le rapport du nombre de cellules associées à une zone de dégradation sur le nombre de cellules totales. On observe à la figure 31C que la proportion de cellules dégradant la gélatine est augmentée chez les CMV-TGF β et les T β R-1^{T204D} par rapport aux cellules contrôles. On remarque également une diminution de la formation d'invadopodes chez les CMV-TGF β ^{275AHRA278} et chez les CMV-PDX par rapport aux cellules contrôles. Par contre, lorsqu'on coexprime le T β R-1^{T204D}, qui reconstitue la signalisation du TGF β , avec le CMV-PDX, il y a une augmentation du nombre de cellules dégradant la matrice. Il y a donc reconstitution partielle de la formation d'invadopodes chez ces transfectants.

Ces résultats indiquent que la maturation du TGF β favorise la formation d'invadopodes, ce qui corrèle avec les résultats obtenus pour la production de la MMP-2 active. De plus, le TGF β est en partie responsable des effets de la furine sur la formation des invadopodes tel que démontré grâce à l'expérience de reconstitution de la signalisation du TGF β chez les CMV-PDX.

3.3.3.4 La motilité cellulaire

Un autre facteur impliqué dans l'invasion cellulaire est la motilité. Cet aspect a été observé chez les transfectants stables en utilisant la technique de rétrécissement des plaies. Afin de comparer le phénotype des cellules, des marquages de l'actine en immunofluorescence ont été effectués. Les essais se sont déroulés sur 24 heures.

À la figure 32A, on observe que les CMV-TGF β sont nettement plus motiles que les cellules contrôles, alors que la motilité des CMV-TGF $\beta^{275\text{AHRA}278}$ et des CMV-PDX est fortement réduite. La différence est déjà évidente après 12 heures et se maintient à 24 heures. De plus, lorsqu'on coexprime les CMV-PDX avec les T β R-1^{T204D} constitutivement actif, la motilité des cellules est partiellement rétablie si on la compare à celle des CMV-TGF β . À la suite du dénombrement des cellules motiles, on remarque une augmentation d'environ 30% de la capacité de motilité chez ces transfectants stables par rapport aux CMV-PDX (figure 32B).

Afin de mieux comprendre les différences de motilité observées, le phénotype des cellules en mouvement a été étudié. Pour ce, des marquages de l'actine en immunofluorescence ont été effectués à différents temps. Tel que présenté à la figure 33, après 12 heures de migration, on remarque la présence d'actine fibrillaire focalisée chez les CMV-TGF β . Par contre, on retrouve de l'actine sur tout le contour des cellules contrôles et chez les CMV-TGF $\beta^{275\text{AHRA}278}$, alors qu'elle est strictement localisée au niveau des lamellipodes chez les CMV-TGF β .

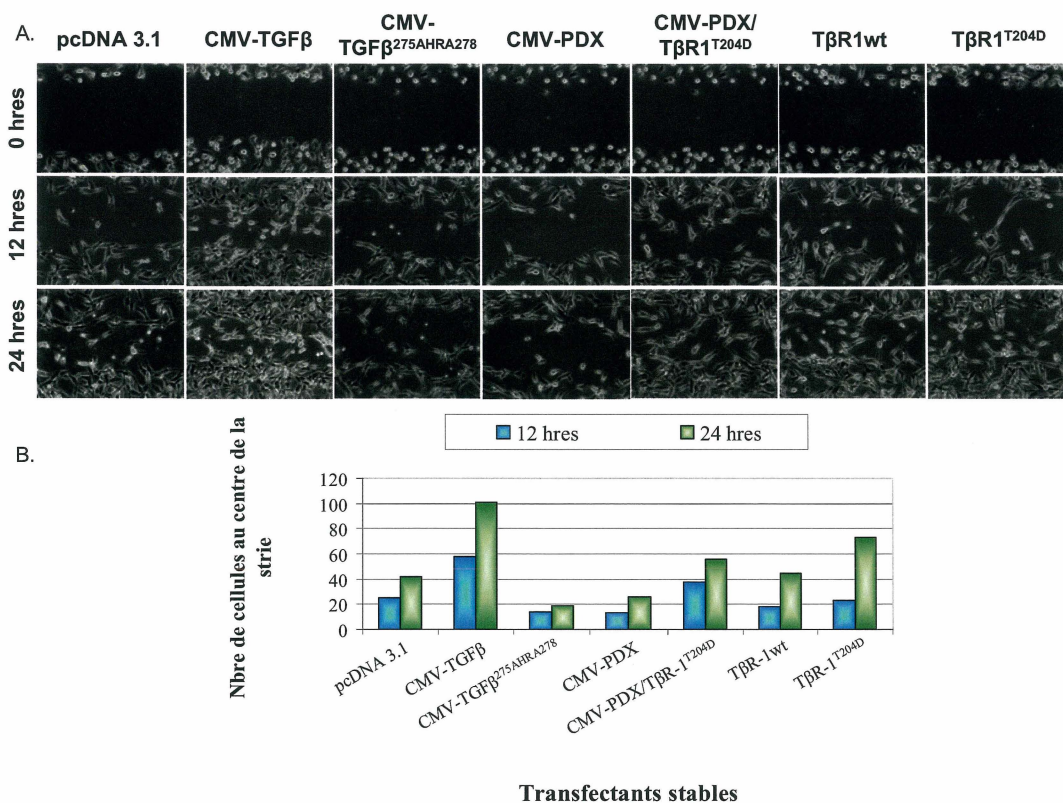


Figure 32 : Impact de la maturation du TGF β par la furine sur la motilité cellulaire. Les essais de motilité se sont déroulés sur 24 heures suivant la formation de la blessure. Les cellules ont été sevrées lors de la formation de la blessure. Chaque micrographie constitue un champ représentatif de cinq champs aléatoires. Les micrographies présentent la progression de la blessure et ont été prises à un grossissement de 160 X. (A) Progression des blessures. (B) Dénombrement des cellules motiles au centre de la blessure. Les résultats obtenus ont été confirmés par une deuxième expérience réalisée dans les mêmes conditions.

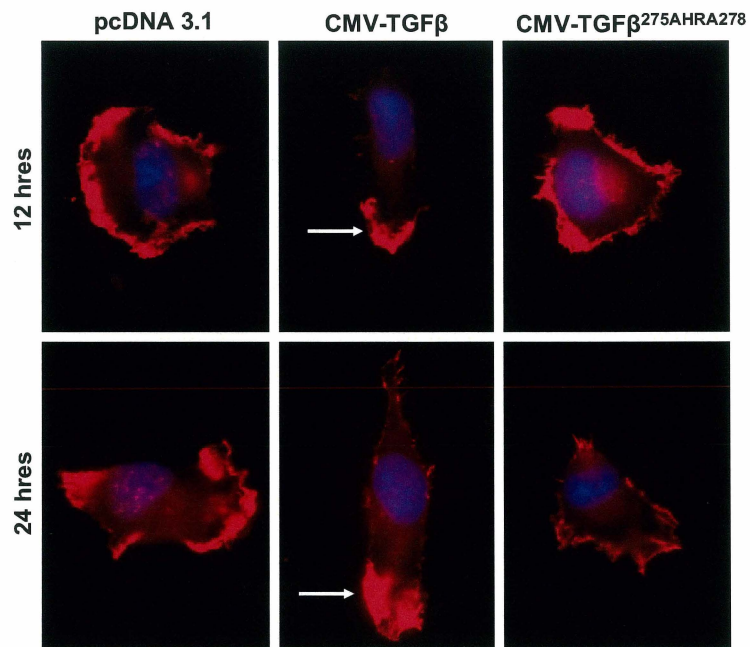


Figure 33 : Caractéristiques phénotypiques des cellules motiles. Les essais de motilité se sont déroulés sur 24 heures suivant la formation de la blessure. Les cellules ont été sevrées lors de la formation de la blessure. Chaque micrographie présente un champ représentatif de cinq champs aléatoires. Les micrographies ont été prises à 1000 X. Les flèches blanches pointent les lamellipodes.

Vingt-quatre heures après le début de l'essai, les lamellipodes sont plus proéminents chez les CMV-TGF β alors que chez les cellules contrôles, on retrouve l'actine sur tout le contour des cellules (figure 33). Chez les CMV-TGF $\beta^{275\text{AHRA}278}$, la présence de l'actine au contour des cellules est fortement diminuée. Chez les cellules contrôles et les CMV-TGF β , on remarque également la présence de longs prolongements, non visibles sur les micrographies présentées, du cytosquelette en direction de la zone de migration des cellules. Ces prolongements semblent plus importants chez les CMV-TGF β et sont absents chez les CMV-TGF $\beta^{275\text{AHRA}278}$. Par ailleurs, on constate que les cellules contrôles et les CMV-TGF $\beta^{275\text{AHRA}278}$ ont une forme plus arrondie comparativement au CMV-TGF β .

Ces résultats suggèrent que la TGF β et la furine augmentent la motilité des cellules. De plus, les résultats obtenus avec les transfectants stables pour le CMV-PDX permettent de conclure que le TGF β est en partie responsable de l'effet de la furine sur la motilité des cellules. Enfin, les études phénotypiques réalisées chez les transfectants stables pour la forme sauvage ou la forme mutée du TGF β au site de clivage de la furine indiquent que les cellules emploient possiblement des modes de migration différents selon que la furine exerce ou non ses fonctions.

3.4 Impact de la maturation du TGF β par la furine sur le type de migration des cellules

Les cellules cancéreuses peuvent utiliser deux principaux types de migration soit la migration mésenchymale, dépendante des métalloprotéases et des intégrines, et la migration amoéboïde, indépendante des métalloprotéases et des intégrines (Wolf et al, 2003). Il a été démontré que ces deux types de migrations sont employés selon le contexte par les cellules HT1080 (Carragher et al, 2006). Le type de migration employé par les différents transfectants stables a été évalué par une étude de la morphologie cellulaire et des essais d'invasion faisant intervenir des inhibiteurs de chacun des types de migration.

3.4.1 La morphologie cellulaire

Les différents transfectants stables ont été cultivés sur une matrice de collagène de type IV à une concentration de 100 µg/ml pendant quelques jours. La morphologie des cellules a été observée par microscopie en contraste de phase. Tel que présenté à la figure 34A, deux principaux phénotypes sont présents chez les *pools* de transfectants stables. En effet, on retrouve une certaine proportion de cellules mésenchymales et une certaine proportion de cellules amoéboïdes chez tous les *pools*. Certaines caractéristiques permettent de distinguer les deux phénotypes. D'une part, les cellules ayant une forme fibroblastoïde allongée et formant de longs prolongements sont considérées mésenchymales. D'autre part, les cellules ayant une morphologie ellipsoïdale ou ronde sans prolongement cytoplasmique important et formant plutôt des structures de migrations telles que les lamellipodes sont considérées amoéboïdes. La

contribution relative de chaque type morphologique varie d'un type de transfectants à l'autre. En effet, on remarque à la figure 34B qu'il y a une plus forte proportion de cellules amoéboïdes chez les CMV-TGF β et les T β R-1^{T204D} que chez les autres transfectants et les cellules contrôles. De plus, on observe une plus forte proportion de cellules mésenchymales chez CMV-PDX et lorsqu'on coexprime le récepteur constitutivement actif de type I avec ce dernier, on rétablit la plus forte présence de cellules amoéboïdes à des niveaux similaires à ceux des CMV-TGF β et des T β R-1^{T204D}.

Ces résultats permettent de conclure que la maturation du TGF β par la furine favorise le développement d'un phénotype amoéboïde. De plus, le TGF β est responsable de l'effet de la furine sur la transition phénotypique des cellules.

3.4.2 Les types de migration

Afin de vérifier le type de migration employé par les différents transfectants stables, des essais d'invasion sur une matrice de collagène de type IV ont été réalisés en inhibant chaque fois un des types de migration. La migration de type mésenchymal a été inhibée à l'aide d'une combinaison de deux inhibiteurs, soit le GM6001 à une concentration de 25 μ M qui inhibe les métalloprotéases et le cocktail d'inhibiteurs *Mini-Complete* qui inhibe les protéases en général dont la plasmine. La migration de type amoéboïde a été inhibée par l'utilisation d'un inhibiteur de ROCK, une kinase induite par RhoA et

responsable de la migration amoéboïde, soit le Y-27632 (Demou et al, 2005) utilisé à une concentration de 10 μ M.

À la figure 35A, on constate qu'une stimulation au TGF β exogène entraîne une augmentation de la migration de type mésenchymal chez les cellules contrôles. Elle a le même effet chez les CMV-TGF $\beta^{275\text{AHRA}278}$, mais elle augmente plutôt la migration de type amoéboïde chez les CMV-TGF β (résultats non présentés). Tel que présenté à la figure 35B, la surexpression de la forme sauvage du TGF β entraîne une augmentation de la migration de type amoéboïde. On observe la même tendance, quoiqu'elle soit plus prononcée, chez les T β R-1^{T204D} qui ont la signalisation du TGF β constitutivement activée. Par contre, on observe plutôt une migration de type mésenchymale chez les CMV-TGF $\beta^{275\text{AHRA}278}$ et les CMV-PDX. De plus, lorsqu'on induit la signalisation du TGF β chez les CMV-PDX avec la coexpression de T β R-1^{T204D}, on retrouve une plus grande proportion de cellules utilisant la migration de type amoéboïde.

Ces résultats permettent de conclure que les TGF β exogène favorise une migration de type mésenchymal, alors que le TGF β surexprimé par les cellules induit plutôt une migration de type amoéboïde. Une surexpression de TGF β à long terme a donc les effets inverses d'une stimulation exogène sur une courte période. De plus, les résultats obtenus avec les transfectants stables pour le PDX permettent de conclure que le TGF β est responsable des effets de la furine sur le type de migration employé par les cellules HT1080.

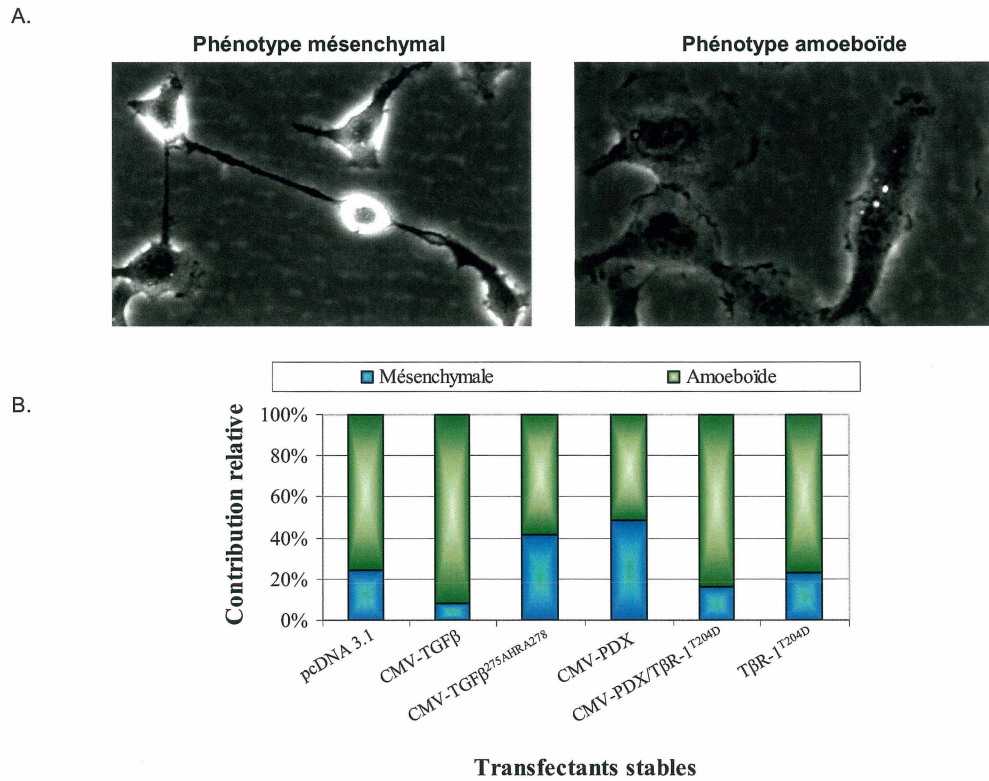
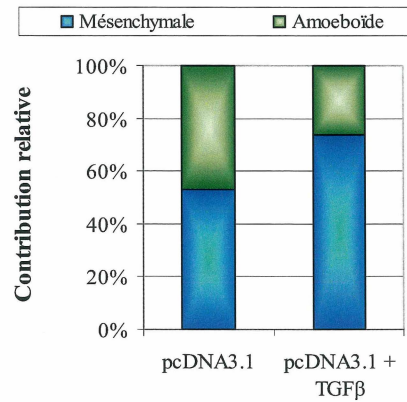


Figure 34 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine sur la morphologie des cellules. Les cellules ont été cultivées pendant 28 heures sur une matrice de collagène de type IV à une concentration de 100µg/ml. Chaque micrographie représente une esquisse d'un champ de cinq champs aléatoires et a été prise à un grossissement de 160 X. (A) Phénotypes observés. Les micrographies présentent un exemple pour chaque phénotype cellulaire. (B) Dénombrement des cellules de type mésenchymal et de type amoéboïde. Le graphique consiste les moyennes obtenues avec deux champs aléatoires pour chaque transfectant stable. Les résultats ont été confirmés dans une seconde expérience réalisée dans les mêmes conditions.

A.



B.

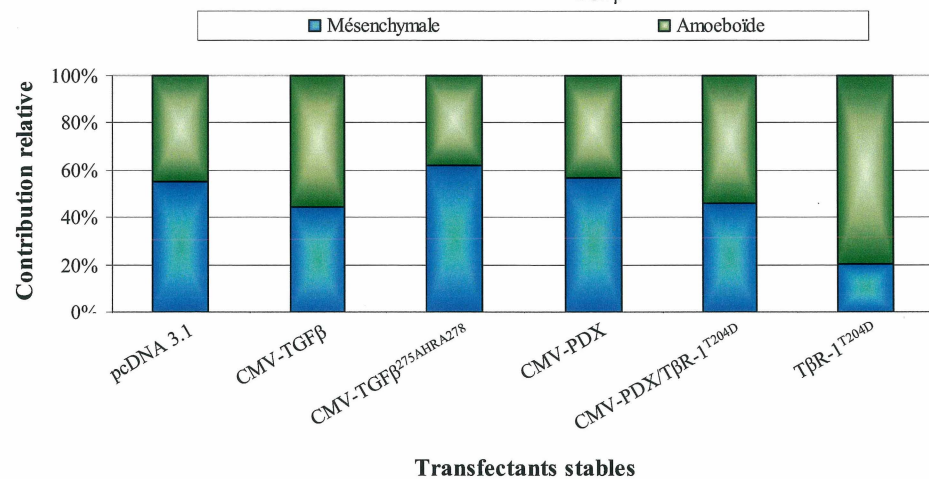


Figure 35 : Impact de la maturation du TGFβ par la furine sur le type de migration des cellules. Les essais ont été effectués dans des chambres de Boyden sur une matrice de collagène de type IV à 100 µg/ml pendant une période de 7 heures. Les inhibiteurs ont été ajoutés au début des essais. La migration amoeboidé a été inhibée par l'ajout de Y27632 à une concentration de 10 µM et la migration mésenchymale a été inhibée par l'ajout de GM6001 à une concentration de 25 µM et du cocktail d'inhibiteurs *Mini-Complete*. (A) Effets de la stimulation exogène au TGFβ. Le TGFβ a été ajouté au début de l'essai à une concentration de 2 ng/ml. (B) Type de migration employée par les transfectants stables.

4. Discussion

Le TGF β est une cytokine complexe. Il peut avoir des effets opposés selon le type cellulaire (Murphy et al, 2004) ou le contexte (Yan et al, 1994 ; Bachman et Park, 2005). Pour illustrer ce fait, on peut prendre l'exemple de la contribution du TGF β à la prolifération cellulaire et à la progression tumorale. D'abord, selon le type cellulaire, le TGF β peut induire ou inhiber la prolifération. Chez les cellules épithéliales, il inhibe la prolifération par un arrêt du cycle cellulaire en G1 (Howe et al, 1991). Par contre, il favorise la prolifération des fibroblastes en induisant la sécrétion du facteur FGF-2 qui active les voies de p38 et de JNK (Khalil et al, 2005). Ensuite, au niveau du cancer du sein, le TGF β joue un rôle protecteur au début du développement du carcinome alors qu'il devient un promoteur de la progression tumorale dans les stades plus avancés (Tang et al, 2003). En effet, au début du développement du carcinome, le TGF β inhibe la prolifération des cellules tumorales, ce qui ralentit la progression tumorale. Plus tard dans le processus, il peut par contre induire l'invasion, la motilité, l'angiogénèse et ainsi favoriser le développement des métastases. Ce même phénomène s'observe chez plusieurs types de tumeurs dont le cancer du colon et le carcinome squameux de l'œsophage (O'Grady et al, 2005 ; Andl et al, 2006). Le mécanisme exact par lequel le TGF β passe du rôle de suppresseur de tumeur au rôle d'oncogène n'est pas encore défini. Il pourrait résulter de mutations, d'une désensibilisation des cellules tumorales au TGF β ou d'une diminution de la réponse au TGF β due à la perte d'expression du T β R-II (Yan et al, 1994 ; Tang et al, 2003 ; Bachman et Park, 2005 ; Andl et al, 2006).

En plus d'avoir des effets distincts selon le contexte, le TGF β interagit avec une panoplie de molécules impliquées dans le cancer lors de son processus de maturation et d'activation. Parmi ces molécules, on retrouve la furine, la plasmine, la thrombospondine, les intégrines et les métalloprotéases (Gleizes et al, 1997). Tous ces acteurs de la maturation et de l'activation du TGF β peuvent être surexprimés ou sous-exprimés dans le contexte tumoral. On peut donc penser que l'interaction entre le TGF β et ces molécules peut changer au cours de la progression tumorale. Le type d'interaction entre le TGF β et chacun de ces acteurs au cours du processus tumoral pourrait peut-être permettre d'expliquer les rôles contradictoires de cette cytokine dans le cancer. À ce niveau, la furine constitue une cible importante à étudier. En plus de jouer un rôle clé dans la maturation du TGF β , la furine peut influencer son activation puisqu'elle est directement impliquée dans la maturation de certains de ses activateurs tels que les intégrines de la famille α_v et les métalloprotéases. Étudier le rôle de la maturation du TGF β par la furine dans la tumorigénèse pourrait mener à de nouvelles pistes afin d'expliquer les effets évolutifs de ce dernier et sa contribution aux effets de la furine dans ce processus.

Le processus tumoral peut se diviser en quatre principales étapes soit la prolifération et la survie cellulaire, la dédifférenciation, l'invasion ainsi que la formation de métastases et l'angiogénèse. Chaque étape doit être prise en considération dans l'étude du rôle de la maturation du TGF β par la furine dans la tumorigénèse.

Le TGF β influence la prolifération et la survie des cellules de façon dépendante du type cellulaire. Dans cette étude, les cellules HT1080 ont été utilisées. Il s'agit de cellules de fibrosarcome humain. Nos résultats obtenus en immunofluorescence (figure 13) démontrent que ces cellules ont un phénotype intermédiaire entre celui des cellules HepG2 et celui des cellules HEK 293, deux lignées épithéliales à des stades de différenciation différents (Graham et al, 1977 ; Darlington et al, 1987). Ces résultats permettent de suggérer que les cellules HT1080 sont de type épithélial et qu'elles sont en partie dédifférenciées. En effet, elles expriment le marqueur mésenchymal vimentine utilisé pour étudier la transition d'un type épithélial à un type mésenchymal (Korsching et al, 2005 ; Zavadil et Bottinger, 2005). Pour confirmer ces résultats, il aurait été pertinent de faire un marquage en immunofluorescence pour la E-cadhérine et la N-cadhérine. L'anticorps qui a été utilisé dans nos recherches reconnaît plusieurs types de cadhérines, soit la E-cadhérine, la N-cadhérine, la P-cadhérine, la V-cadhérine, la R-cadhérine et la T-cadhérine (Geiger et al, 1990 ; Kartenbeck et al, 1991). Or on sait que la E-cadhérine est exprimée de façon préférentielle par les cellules épithéliales alors que la N-cadhérine se retrouve davantage chez les cellules fibroblastiques (Matsuyoshi et Imamura, 1997 ; Li et al, 2002 ; Derycke et Bracke, 2004). Un marquage de ces deux types de cadhérines aurait donc permis de caractériser plus précisément le stade de différenciation des cellules HT1080.

Tel que décrit dans la littérature, le TGF β inhibe la prolifération des cellules épithéliales normales (Howe et al, 1991). L'équipe du Dr Leof a démontré que le TGF β peut inhiber la phosphorylation de la sérine-thréonine kinase p34^{cdc2} et l'activité kinase de l'histone

H1, toutes deux impliquées dans le cycle cellulaire (Howe et al, 1991). Ceci a pour effet d'arrêter le cycle cellulaire en phase G1/S et donc d'inhiber la capacité proliférative des cellules épithéliales. L'équipe du Dr Hill a démontré que cet arrêt du cycle cellulaire est dépendant de Smad4 (Levy et Hill, 2005). L'équipe du Dr Moses avait précédemment démontré que le TGF β peut inhiber la prolifération de plusieurs types cellulaires par la répression du gène c-Myc (Coffey et al, 1988), un proto-oncogène associé à une augmentation de la prolifération, de la croissance cellulaire, de l'apoptose et de la sénescence (Guney et Sedivy, 2006). L'équipe du Dr Wang a récemment démontré que ce mécanisme d'inhibition de la prolifération est dépendant de Smad3 (Frederick et al, 2004). Le pouvoir inhibiteur du TGF β semble donc bien établi et peut s'expliquer par au moins deux mécanismes. Par contre, une autre équipe de recherche a démontré que le TGF β peut favoriser la prolifération des cellules épithéliales dans un contexte tumoral et ce, même à un stade précoce du développement tumoral (Lu et al, 2004). Le mécanisme par lequel le TGF β induit la prolifération cellulaire dans ce système n'est pas totalement élucidé, mais il pourrait s'agir d'une conséquence de l'augmentation de l'angiogénèse et de la production d'une panoplie de cytokines. Cette hypothèse est renforcée par l'expression accrue du récepteur ALK-1 et des Smads 1, 3 et 5 dans ce système (Lu et al, 2004).

Dans la majorité des études sur les effets du TGF β , des concentrations élevées de TGF β sont utilisées. On retrouve souvent des stimulations avec 2 à 10 ng/ml de TGF β exogène. Dans la dernière étude présentée, ce sont de faibles concentrations qui ont été utilisées, soit au plus 1 ng de TGF β par mg de protéines. Nos résultats obtenus en

incorporation de thymidine tritiée (figure 14) démontrent que le TGF β peut induire la prolifération des cellules épithéliales HT1080 à de faibles concentrations, soit moins de 5 ng/ml. À des concentrations plus élevées, le TGF β perd son impact sur la prolifération cellulaire pour revenir à des niveaux de base lorsque la concentration atteint 40 ng/ml. La concentration de TGF β bioactif présente dans le milieu semble donc importante pour son effet différentiel sur la prolifération des cellules HT1080.

Bien que plus d'une étude démontre que le TGF β régule la prolifération cellulaire à la baisse par la voie des Smads, il a été démontré que la voie de PI3K (Wilkes et al, 2005), ainsi que les voies de p38 et JNK (Khalil et al, 2005), peuvent être impliquées dans l'induction de la prolifération chez les fibroblastes. Or on sait que certaines de ces voies peuvent interagir entre elles. Par exemple, JNK peut augmenter l'activation de la voies des Smads en phosphorylant les R-Smads (Engel et al, 1999 ; Mori et al, 2004). Une fois activé, le Smad3 peut induire le facteur p38 (Leivonen et al, 2006) qui pourrait être impliqué dans l'activation de JNK (Hocavar et al, 1999) entraînant un boucle d'amplification de la voie des Smads. Par ailleurs, il est connu que la voie de Ras est constitutivement active chez les cellules HT1080 (Gupta et al, 2000 ; Gupta et Stanbridge, 2001 ; Gupta et al, 2001). La voie de Ras mène entre autres à l'activation de ERK1/2 qui peut inhiber la voie des Smads (Kretzschmar et al, 1999). On peut penser qu'à long terme et selon l'intensité de la stimulation, la signalisation par la boucle d'amplification des Smads ou celle de la voie de Ras sera privilégiée. À de fortes concentrations, la voie de signalisation des Smads pourrait être favorisée par rapport à celle de Ras par la plus forte activation de T β R-1 et par la boucle d'amplification entre

p38 et JNK. Ceci pourrait expliquer l'inhibition de la prolifération observée. Par contre, à de plus faibles concentrations, on peut supposer que la voie des Smads est inhibée par ERK1/2 puisque la voie de Ras est fortement activée. Par conséquent, l'effet inhibiteur de la voie des Smads sur la prolifération cellulaire est diminué et on peut observer une augmentation de la prolifération médiée par la voie de PI3K et p38. Des essais de prolifération par incorporation de thymidine tritiée utilisant des inhibiteurs spécifiques à chacune de ces voies nous permettraient de valider ces hypothèses.

À la suite de la détermination des effets du TGF β exogène sur la prolifération des cellules HT1080 en culture, nous avons déterminé le rôle de la maturation du TGF β par la furine dans ce processus. On constate à l'aide d'essais d'incorporation de thymidine tritiée que la capacité de prolifération des transfectants stables pour la forme mutée du TGF β au site de clivage par la furine est équivalente à celle des transfectants stables pour la forme sauvage de celui-ci (figure 24). Ces données concordent avec les effets observés pour les cellules HT1080 parentales stimulées avec des doses croissantes de TGF β (figure 14). En effet, les transfectants stables pour la forme mutée du TGF β sécrètent environ 1 ng/ml de TGF β bioactif alors que celui pour la forme sauvage en sécrète plus de 5 ng/ml (figure 20). Or nos résultats obtenus pour les cellules parentales stimulées au TGF β exogène démontrent que ce dernier induit la prolifération à de faibles concentrations et que cet effet stimulateur diminue à de plus fortes concentrations, soit des concentrations supérieures à 5 ng/ml (figure 14). De plus, on observe un plateau entre 2 ng/ml et 5 ng/ml de TGF β exogène. Il n'est donc pas étonnant que la prolifération des cellules soit aussi importante chez les deux transfectants. Par contre,

on constate que lorsqu'on inhibe la furine avec le PDX, il y a une forte inhibition de la prolifération (figure 24). Ceci peut s'expliquer par le fait que les cellules ont besoin d'un seuil minimal de stimulation par les facteurs de croissance pour proliférer. En effet, il a été démontré que les cellules nécessitent de 5% à 10% de sérum pour proliférer de façon continue (Holley, 1975) et qu'en absence de sérum, la capacité de prolifération peut être rétablie par l'ajout de facteurs de croissance exogènes dans le milieu tels que le PDGF, l'EGF et l'insuline (Larsson et al, 1985). Or le TGF β endogène est un facteur de croissance important chez les cellules transformées. Par conséquent, si on inhibe la maturation de ce dernier et qu'on maintient les cellules dans un état de sevrage, il est normal que leur prolifération soit grandement réduite. D'ailleurs, lorsqu'on stimule les cellules exprimant l'inhibiteur de la furine avec du TGF β exogène, on rétablit la capacité de prolifération à des niveaux similaires à ceux observés chez les transfectants stables pour la forme sauvage du TGF β (résultat non présenté). On observe également une récupération de la capacité de prolifération des cellules lorsqu'on coexprime l'inhibiteur de la furine et le récepteur T β R-I constitutivement actif chez les cellules HT1080 (figure 24). Même si ces cotransfectants stables sécrètent des taux de TGF β bioactif comparables à ceux des cellules contrôles (figure 20), les mécanismes de transduction du signal reliés au TGF β semblent être constitutivement actifs tel que démontré par l'augmentation des niveaux de Smad2 phosphorylé qui sont comparables à ceux des transfectants stables exprimant la forme sauvage du TGF β (figure 21) et la localisation nucléaire de la forme phosphorylée de Smad2 et de Smad3 (figure 22). Ces résultats indiquent que le TGF β est responsable de l'effet de la furine sur la prolifération cellulaire.

Afin de consolider les résultats obtenus *in vitro*, nous avons établi un modèle *in vivo* de progression tumorale. Pour ce, nous avons induit des tumeurs à partir des transfectants stables exprimant la forme sauvage ou la forme mutée du TGF β au site de clivage par la furine chez des souris nu/nu. On constate que chez les tumeurs issues de l'injection des transfectants stables exprimant la forme mutée du TGF β au site de clivage par la furine, la voie de signalisation principale du TGF β , soit la voie des Smads, est faiblement induite (figure 26). On peut donc penser qu'il y a très peu de TGF β bioactif dans l'environnement tumoral de celles-ci. Toutefois, pour confirmer ceci, il faudrait doser le TGF β bioactif dans les lysats protéiques des tumeurs par ELISA. Comme pour les expériences *in vitro*, on remarque que les tumeurs issues de l'injection des transfectants stables exprimant la forme mutée du TGF β au site de clivage par la furine progressent plus rapidement que celles issues des transfectants stables exprimant sa forme sauvage (figure 25). Ceci vient consolider l'hypothèse voulant que la maturation du TGF β par la furine ait un effet protecteur sur le développement tumoral du point de vue de la prolifération cellulaire. Afin de mieux caractériser le rôle de chaque voie de signalisation dans la prolifération des cellules en réponse au TGF β , il serait intéressant de refaire les mêmes expériences en comparant les cellules HT1080, qui ont une voie de Ras constitutivement active, aux cellules MCH603, une sous-population de HT1080 qui a subi une mutation ayant entraîné la perte de l'allèle constitutivement active de Ras (Gupta et al, 2000 ; Gupta et al, 2001). De cette façon, on pourrait déterminer si l'effet protecteur de la maturation du TGF β par la furine est présent uniquement chez les tumeurs possédant un Ras constitutivement actif ou s'il s'applique à toutes les tumeurs.

Il serait également intéressant de vérifier le niveau d'expression du T β R-II à la surface des cellules afin de déterminer si les effets observés sont imputables à une perte ou une diminution de la réponse au TGF β par les cellules HT1080 exprimant le TGF β de type sauvage. En effet, il a été démontré par l'équipe du Dr Rustgi que lors de la transition d'un type cellulaire épithélial à un type cellulaire mésenchymal, il y a perte d'expression de la E-cadhérine qui interagit avec le récepteur T β R-II par son domaine extracellulaire (Andl et al, 2006). Cette perte d'expression entraîne une diminution d'expression du T β R-II à la surface cellulaire, par l'endocytose et possiblement la dégradation du récepteur, et ainsi une résistance des cellules au TGF β (Andl et al, 2006).

Une fois que les cellules tumorales ont acquis un avantage de prolifération, elles doivent développer leur capacité d'interagir avec l'environnement. Pour ce faire, les cellules se dédifférencient afin de revenir au stade mésenchymal. Le TGF β est impliqué de différentes façons dans la transition des cellules d'un type épithélial vers un type mésenchymal (Huber et al, 2005 ; Zavadil et Böttinger, 2005 ; Medici et al, 2006 ; Rees et al, 2006). Il participe d'abord à la répression de la E-cadhérine aux jonctions intercellulaires. L'équipe du Dr Filtzgerald a démontré que le TGF β peut induire l'expression de S1P qui est un inhibiteur de l'expression de la E-cadhérine (Rees et al, 2006). L'équipe du Dr Cano a aussi démontré que le TGF β peut collaborer avec FGF-2 et Ras pour induire l'expression de Snail, un important inhibiteur de la E-cadhérine qui est fortement impliqué dans la dédifférenciation cellulaire chez les cellules épithéliales (Peinado et al, 2003). L'équipe du Dr Goodenough a confirmé ces résultats et a clarifié les mécanismes impliqués (Medici et al, 2006). En fait, la voie de Ras est impliquée

dans l'induction de Snail qui diminue de moitié l'expression de la E-cadhérine, des claudines et des occludines. Ensuite, une interaction entre la voie des Smads et la voie de PI3K permet l'inhibition de la GSK3 β et, ainsi, le recrutement de la β -caténine au noyau, ce qui médie la suite de la transition d'un type épithélial vers un type mésenchymal et la perte finale de la E-cadhérine aux jonctions intercellulaires (Medici et al, 2006). En plus d'induire la transition des cellules épithéliales vers un type mésenchymal, le TGF β peut être impliqué dans d'autres conversions phénotypiques. Entre autres, il peut induire un changement phénotypique chez les hépatocytes, ce qui leur confère une morphologie fibroblastoïde favorisant un caractère plus invasif (Gotzmann et al, 2002).

Nos résultats obtenus en immunofluorescence (figure 27) ne démontrent pas de façon claire une implication de la maturation du TGF β par la furine dans le processus de dédifférenciation. En fait, chez les transfectants stables pour la forme mutée du TGF β au site de clivage par la furine, on observe une désorganisation de l'actine et une localisation concentrée aux jonctions intercellulaires. Par ailleurs, chez les transfectants stables pour la forme sauvage du TGF β et pour son récepteur T β R-I, à la suite d'une stimulation au TGF β exogène, il y a rétablissement de l'organisation de l'actine et une relocalisation au cytoplasme. Lors de la dédifférenciation, on observe en général une organisation de l'actine en fibres de stress (Tumbarello et al, 2005) telles que celles observées chez les transfectants stables pour la forme sauvage du TGF β . Par contre, on observe normalement une induction de l'expression du marqueur vimentine lorsque la cellule atteint un stade de différenciation mésenchymal (Zavadil et Böttinger, 2005).

Toutefois, nos résultats montrent que l'organisation de l'actine en filaments concorde avec une perte d'expression de la vimentine. Ceci indiquerait une redifférenciation plutôt qu'une dédifférenciation. Enfin, au cours de la dédifférenciation, on observe une perte de l'expression de la E-cadhérine aux jonctions intercellulaires (Huber et al, 2005 ; Zavadil et Böttinger, 2005). Nos résultats montrent une réorganisation des jonctions intercellulaires, mais pas de perte d'expression des cadhérines. Ceci peut s'expliquer par le fait que dans le développement tumoral, il y a perte de l'expression de la E-cadhérine et gain d'expression de la N-cadhérine et, dans une moindre mesure, de la cadhérine 11 aux jonctions intercellulaires (Tomita et al, 2000 ; Cavallaro et al, 2002). En fait, la perte d'expression de la E-cadhérine semble correspondre au gain de N-cadhérine aux jonctions intercellulaires (Li et al, 2002). Tel que discuté précédemment, l'anticorps utilisé ne permet pas d'observer ce changement d'expression. Un marquage en immunofluorescence de la E-cadhérine et de la N-cadhérine avec des anticorps spécifiques permettrait de mieux étudier les variations au niveau des jonctions cellulaires.

En résumé, nos résultats semblent indiquer que la maturation du TGF β par la furine aurait un rôle protecteur sur les tumeurs primaires puisqu'en inhibant leur capacité de dédifférenciation, elle rend l'invasion cellulaire plus difficile. Par contre, elle aurait un rôle promoteur sur les métastases puisqu'en favorisant leur redifférenciation, elle leur permet d'interagir avec un nouvel environnement pour former une tumeur secondaire.

Afin de mieux comprendre le rôle de la maturation du TGF β dans le processus de dédifférenciation, il serait intéressant de vérifier l'expression de Snail et de la β -caténine par PCR quantitatif en temps réel ou par immunofluorescence chez les différents transfectants stables. Ce sont deux acteurs importants dans le processus et dans la perte d'expression de la E-cadhérine. Les cadhérines sont impliquées dans l'adhésion entre les cellules, mais les cellules tumorales doivent aussi interagir avec la matrice extracellulaire. Cette dernière adhésion est assurée par les intégrines (Petruzzelli et al, 1999). Il serait donc pertinent d'observer l'expression des intégrines par immunofluorescence ou par cytométrie de flux. De plus, l'expression de la E-cadhérine, de la N-cadhérine, de Snail et de la β -caténine pourrait être évaluée chez les tumeurs obtenues dans notre modèle de progression tumoral. On pourrait ainsi confirmer les résultats obtenus *in vitro*.

Une fois dédifférenciées, les cellules tumorales commencent à envahir les tissus pour atteindre la circulation sanguine et former des métastases. Le TGF β est aussi impliqué dans l'invasion cellulaire. Le rôle du TGF β dans ce processus est un peu contradictoire. Dans certains cas, le TGF β induit l'invasion cellulaire et dans d'autres cas, il l'inhibe. Plusieurs études démontrent l'implication du TGF β dans l'induction de l'invasion cellulaire. L'équipe du Dr Cano a démontré que le TGF β peut induire l'expression de Snail chez les cellules épithéliales (Peinado et al, 2003). Ce laboratoire a ensuite démontré que Snail collabore avec E47 pour inhiber l'expression de la E-cadhérine et que la perte d'adhésion intercellulaire qui en découle se manifeste par une augmentation de la capacité d'invasion de ces cellules (Peinado et al, 2004). L'équipe du Dr

Stamenkovic a pour sa part démontré que la MMP-9 peut activer le TGF β chez les cellules tumorales. À la suite de cette activation du TGF β , ils observent une augmentation de la capacité d'invasion des cellules tumorales (Yu et Stamenkovic, 2000). Le laboratoire du Dr Leask a établi que le TGF β induit l'expression de CTGF/CCN2, un promoteur de la migration cellulaire, par une coopération entre Smad3 et Ets-1 chez les fibroblastes (Van Beek et al, 2006). Enfin, l'équipe du Dr Miyoshi a tenté de comprendre le mécanisme par lequel le TGF β promeut l'invasion des cellules chez les hépatomes. Ils ont déterminé que de fortes concentrations de TGF β , soit de l'ordre de 10 ng/ml, augmentent l'expression de LMO7, un facteur de transcription, et de LMO7S, un variant obtenu par épissage alternatif. L'induction de l'expression de ces deux facteurs corrèle avec l'augmentation de l'invasion des hépatomes (Nakamura et al, 2005).

D'autres études démontrent que le TGF β peut inhiber l'invasion cellulaire. Une première étude menée dans le laboratoire du Dr Yamada a démontré que le TGF β peut inhiber l'invasion des cellules HT1080 en induisant fortement l'expression des TIMPs (Kubota et al, 1991). L'équipe du Dr Hong a confirmé ces résultats et en a précisé le mécanisme. Le TGF β induit l'expression de TIMP-1 par la voie de ERK1/2 et Sp1 (Kwak et al, 2006). L'équipe du Dr Sisley a démontré dans deux études que le TGF β inhibe l'invasion des cellules tumorales de mélanomes oculaires (Woodward et al, 2002 ; Woodward et al, 2005).

En accord avec la littérature citée précédemment, nos résultats obtenus pour les essais d'invasion sur une matrice de collagène de type IV sont contradictoires. Lorsqu'on stimule les cellules HT1080 avec des doses croissantes de TGF β , on obtient une augmentation de l'invasion qui semble concentration-dépendante (figure 16). Le TGF β semble donc induire l'invasion des cellules HT1080. Par contre, lorsqu'on refait la même expérience avec les transfectants stables exprimant la forme sauvage du TGF β ou sa forme mutée au site de clivage par la furine, on obtient l'effet inverse. Les transfectants stables exprimant la forme sauvage du TGF β sont moins invasifs que ceux exprimant la forme mutée au site de clivage par la furine (figure 28). De plus, lorsqu'on inhibe la furine avec le PDX, on observe une augmentation de l'invasion des cellules et si on coexprime la forme constitutivement active du récepteur T β R-I avec le PDX, on observe une inhibition de l'invasion équivalente à celle observée pour les transfectants stables exprimant la forme sauvage du TGF β (figure 28). De plus, à la suite d'une stimulation avec du TGF β exogène, on observe une augmentation de l'invasion cellulaire chez tous les transfectants stables étudiés (résultat non présenté).

Un premier facteur pourrait expliquer le résultat obtenu pour les transfectants stables exprimant la forme sauvage du TGF β . Nos résultats obtenus en PCR quantitatif en temps réel démontrent que l'expression de PAI-1, un inhibiteur de la maturation du plasminogène en plasmine, est fortement augmentée chez ces transfectants (figure 19a). La plasmine est impliquée dans la migration cellulaire puisqu'elle peut cliver des constituants de la matrice extracellulaire tels que le collagène (Vassalli et al, 2001). Or en présence de PAI-1, l'expression de la plasmine est réduite et, par conséquent, il est

normal d'observer une inhibition de l'invasion de type mésenchymal qui nécessite la dégradation des fibres de collagène. Ce phénomène s'explique par l'implication de plusieurs facteurs du système du plasminogène dans l'invasion cellulaire. D'abord, chez les cellules HT1080, une forte activité de l'uPA, un activateur du plasminogène, entraîne une augmentation de la capacité d'intravasation de ces cellules (Madsen et al, 2006). Par la suite, on sait que chez ces cellules, les récepteurs uPAR de l'uPA sont nécessaires pour la signalisation de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ en réponse à la fibronectine et sont ainsi impliqués dans l'invasion tumorale (Wei et al, 2006). Par ailleurs, le tPA augmente pour sa part l'expression de la MMP-9 (Hu et al, 2006). De plus, la plasmine est un important activateur de plusieurs métalloprotéases de type gélatinases (Cai et al, 2005) et de la collagénase MMP-1 (Davis et al, 2001). Enfin, chez les cellules HT1080, en présence de la plasmine, la proMMP-2 et la proMMP-9 sont activées par celle-ci de façon indépendante de la MT1-MMP, ce qui augmente l'invasion cellulaire sur une matrice de collagène de type IV (Mazzieri et al, 1997). Par conséquent, la réduction de la capacité d'invasion des transfectants stables CMV-TGF β pourrait être dû à la diminution de l'activité de la plasmine par la forte présence de l'inhibiteur PAI-1.

Un deuxième facteur pourrait être impliqué dans la diminution de la capacité d'invasion des CMV-TGF β . En absence de vimentine, la réorganisation de l'actine est inefficace ce qui entraîne une diminution de la motilité des cellules (Eckes et al, 1998). L'expression de la vimentine est réduite chez les transfectants stables pour la forme sauvage du TGF β (figure 27). On peut donc penser que ces cellules ont une réorganisation de l'actine partiellement déficiente et donc une capacité de motilité limitée. Ceci expliquerait la

diminution de l'invasion chez ceux-ci. Par contre, nos résultats obtenus dans les essais de motilité par rétrécissement des plaies indiquent une augmentation de la motilité chez les CMV-TGF β par rapport aux cellules contrôles (figure 32) et une réorganisation de l'actine pour former des lamellipodes (figure 33). Ces résultats suggèrent que la vimentine ne joue pas de rôles dans la diminution de la capacité d'invasion des CMV-TGF β .

Pour tenter de mieux expliquer les résultats que nous avons obtenus en invasion, nous avons décortiqué le processus d'invasion et nous avons étudié quatre facettes du processus, soit l'adhésion cellulaire, la production de MMP-2, la formation d'invadopodes et la motilité.

Très peu d'études ont vérifié le rôle du TGF β dans l'adhésion cellulaire et les résultats varient quelque peu entre elles. D'abord, l'équipe du Dr Wen a démontré que le TGF β peut promouvoir l'adhésion des cellules de cancers gastriques (Wang et al, 2006). Le laboratoire du Dr Kim a démontré que la protéine de la matrice extracellulaire big-h3, induite entre autres par le TGF β , augmente l'adhésion des cellules par une interaction avec l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ dans le processus de l'athérosclérose (Lee et al, 2006). Par contre, l'équipe du Dr Sisley a démontré que le TGF β_1 n'a aucun effet sur la capacité d'adhésion des cellules de mélanome oculaire. Seul l'isoforme TGF β_2 tend à augmenter l'adhésion de ces cellules (Woodward et al, 2005). L'équipe du Dr Menke a aussi démontré qu'une stimulation des cellules d'adénocarcinome de pancréas avec du TGF β exogène entraîne une réduction d'environ 50% de leur capacité d'agrégation, une autre

forme d'adhésion, par un mécanisme impliquant la voie de PI3K (Vogelmann et al, 2005). L'effet du TGF β sur l'adhésion des cellules dans un contexte tumoral n'est donc pas très bien défini dans la littérature.

Nos résultats obtenus dans les essais d'adhésion sur une matrice de collagène de type IV indiquent que le TGF β induit l'adhésion des cellules HT1080 de façon importante à des concentrations inférieures à 10 ng/ml (figure 15). À de plus fortes concentrations, l'augmentation de l'adhésion par le TGF β est progressivement réduite. De plus, lorsqu'on fait la même expérience en utilisant les transfectants stables exprimant la forme sauvage du TGF β ou sa forme mutée au site de clivage par la furine, on obtient les mêmes résultats, c'est-à-dire que les transfectants stables pour la forme sauvage du TGF β ont une meilleure capacité d'adhésion que les transfectants stables pour la forme mutée au site de clivage par la furine et le CMV-PDX (figure 29). Par contre, lorsqu'on rétablit la signalisation du TGF β chez les CMV-PDX avec le T β R-1^{T204D}, la capacité d'adhésion des cellules n'est pas rétablie. Par conséquent, le TGF β ne semble pas impliqué dans les effets de la furine sur la capacité d'adhésion des cellules. Ces deux facteurs doivent donc utiliser deux mécanismes différents pour exercer leurs fonctions dans ce contexte. On peut penser que le TGF β agit plutôt sur les protéines de la matrice extracellulaire (Lee et al, 2006) alors que la furine agit au niveau de l'activation des intégrines (Lehmann et al, 1996 ; Lissitzky et al, 2000). Pour comprendre le mécanisme impliqué dans ce processus, il serait intéressant de vérifier l'expression des intégrines par immunofluorescence ou par cytométrie de flux chez les différents transfectants et ce, en présence ou en absence d'une stimulation au TGF β . D'une part, les intégrines de la

famille α_3 pourraient être observées puisqu'elles sont des substrats de la furine (Lehmann et al, 1996). D'autre part, les intégrines $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$ et $\alpha_v\beta_8$ pourraient également être étudiées puisqu'elles sont impliquées dans le processus d'activation du TGF β (Asano et al, 2005 ; Cambier et al, 2005 ; Fontana et al, 2005). De plus, une vérification de l'effet du TGF β sur la capacité d'agrégation des cellules HT1080 pourrait venir compléter l'étude de l'impact de celui-ci sur l'adhésion cellulaire.

Tel que discuté, nos résultats démontrent que la maturation du TGF β par la furine entraîne une augmentation de la capacité d'adhésion des cellules HT1080. On sait que les cellules doivent être en mesure d'interagir avec la matrice extracellulaire pour le processus d'invasion cellulaire. Par contre, l'adhésion ne doit pas être trop forte afin que les cellules puissent se détacher de la matrice extracellulaire et se déplacer. Il est possible que la stimulation au TGF β entraîne une augmentation de l'adhésion cellulaire suffisante pour permettre l'interaction avec la matrice cellulaire, mais sans être excédante afin de permettre le détachement et la migration des cellules. Ceci expliquerait que la stimulation des cellules HT1080 avec des doses croissantes de TGF β induit l'invasion cellulaire. Par contre, une stimulation soutenue des cellules au TGF β , comme dans le cas des transfectants stables exprimant la forme sauvage du TGF β , pourrait briser cet équilibre ; à long terme l'adhésion pourrait, bien qu'elle demeure équivalente en force, devenir plus stable et plus difficile à rompre. On sait par exemple qu'une stimulation soutenue au TGF β est nécessaire afin d'augmenter l'expression de la furine et ainsi augmenter l'activation des intégrines impliquées dans l'adhésion cellulaire (Blanchette et al, 1997 ; Posthaus et al, 2003). Ceci pourrait expliquer que les

transfectants stables exprimant la forme sauvage du TGF β possède une capacité d'invasion réduite ; les cellules adhèrent à la matrice extracellulaire et peuvent interagir avec elle, mais elles n'ont pas la capacité de se détacher pour migrer. Dans ce contexte, la maturation du TGF β par la furine aurait un rôle protecteur sur le développement tumoral en inhibant la progression de la tumeur et la capacité des cellules d'atteindre la circulation sanguine puisqu'elle permet de maintenir une concentration élevée constante de TGF β dans l'environnement tumoral.

Lorsque les cellules interagissent avec la matrice extracellulaire, elles peuvent employer deux modes de migration (Wolf et al, 2003 ; Carragher et al, 2006). Dans le premier type de migration, la migration mésenchymale, les cellules doivent dégrader la matrice extracellulaire pour migrer et atteindre les vaisseaux sanguins. Dans le second mode de migration, la migration amoéboïde, les cellules doivent exercer des forces sur les constituants de la matrice extracellulaire afin de la déformer et pouvoir la traverser. La migration mésenchymale est la mieux connue et fait intervenir les métalloprotéases, dont la MMP-2, pour dégrader les constituants de la matrice extracellulaire. Le TGF β est connu pour augmenter l'expression de certaines métalloprotéases telles que la MMP-2, la MMP-9 et la MMP-13 (Leivonen et al, 2002 ; McMahon et al, 2003 ; Stuelten et al, 2005). L'équipe du Dr Kähäri a démontré que le TGF β induit l'expression de la MMP-13 chez les fibroblastes par l'intervention de Smad3 et de la voie de p38 (Leivonen et al, 2002). Le laboratoire du Dre Roberts a démontré que les cellules du cancer du sein induisent l'expression de la MMP-9 par les fibroblastes du stroma par la sécrétion de TGF β , de TNF- α ou de EGF et que l'EGF peut potentialiser les effets du TGF β et du

TNF- α à ce niveau (Stuelten et al, 2005). Enfin, l'équipe du Dre Dubois a démontré que le TGF β induit l'expression de MMP-2 latente chez les cellules LoVo sans moduler l'expression de la MT1-MMP impliquée dans la maturation de la MMP-2 (McMahon et al, 2003). Toutes les études concordent sur le fait que le TGF β est un inducteur de l'expression des métalloprotéases.

Nos résultats obtenus en zymographie démontrent que le TGF β induit l'expression de la MMP-2 active de façon concentration-dépendante sans toutefois moduler l'expression de la MMP-2 latente (figure 17). Ceci appuie nos résultats obtenus pour les essais d'invasion. Comme le TGF β induit la production de MMP-2 active, il stimule la dégradation du collagène et favorise ainsi l'invasion cellulaire. Nos résultats obtenus en zymographie avec les transfectants stables exprimant la forme sauvage du TGF β ou sa forme mutée au site de clivage par la furine vont dans le même sens. En effet, on n'observe pas de différence entre les différents transfectants stables pour la forme latente de la MMP-2 (figure 30). Par contre, on remarque une augmentation de la production de la MMP-2 active chez les CMV-TGF β par rapport aux cellules contrôles, aux CMV-TGF $\beta^{275\text{AHRA}278}$ et aux CMV-PDX (figure 30). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus en PCR quantitatif en temps réel qui démontrent une augmentation de l'expression de la MT1-MMP, impliquée dans la maturation de la MMP-2, chez les transfectants stables exprimant la forme sauvage du TGF β (figure 23d). Par ailleurs, lorsqu'on coexprime le T β R-1^{T204D} avec le CMV-PDX, on observe une augmentation de la production de MMP-2 active comparable à celles des CMV-TGF β (figure 30), indiquant que le TGF β est responsable de l'effet de la furine sur la production de la

MMP-2 active. Les résultats obtenus avec les transfectants stables sont cohérents avec ceux obtenus en stimulant les cellules parentales ; lorsqu'il y a une plus forte concentration de TGF β bioactif dans le milieu, la production de MMP-2 est plus importante. Par conséquent, on s'attend à ce que les cellules migrent davantage en réponse au TGF β . C'est d'ailleurs ce qu'on observe chez les cellules parentales stimulées avec des doses croissantes de TGF β exogène (figure 16). Par contre, on observe l'inverse chez les transfectants stables (figure 28). Chez ces derniers, on peut penser que le TGF β induit l'expression de l'inhibiteur du système du plasminogène, le PAI-1, et inhibe l'expression de la vimentine ce qui entraîne la réduction de la capacité d'invasion des cellules. Par contre, il est étonnant qu'une stimulation exogène au TGF β des cellules HT1080 entraîne une augmentation de l'invasion alors que la surexpression du TGF β endogène chez CMV-TGF β entraîne une diminution de l'invasion par des mécanismes visiblement différents.

Il est possible que le Smad7, un inhibiteur majeur de la voie des Smads, dont l'expression est induite par le TGF β (Afrakhte et al, 1998 ; Itoh et al, 1998 ; von Gersdorff et al, 2000 ; Brodin et al, 2000 ; Hua et al, 2000 ; Uchida et al, 2001) soit davantage présent chez les CMV-TGF β que chez les autres transfectants. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons tenté d'évaluer l'expression de Smad7 chez les transfectants stables par RT-PCR et par PCR quantitatif en temps réel. Quatre paires différentes d'oligonucléotides choisies dans la littérature ou créées à l'aide du programme Vector NTI ont été testées, mais aucune n'a permis d'obtenir des résultats concluants. Nous avons aussi tenté de vérifier l'expression protéique de Smad7 par immunobuvardage de

type Western, mais l'anticorps utilisé n'était pas suffisamment spécifique pour conclure quoi que ce soit. L'utilisation d'un anticorps plus performant permettrait peut-être de visualiser la protéine. Par ailleurs, notre incapacité à doser l'expression génique ou protéique de Smad7 peut également indiquer que sa présence est peu importante chez tous les transfectants dont les CMV-TGF β . Des études complémentaires seraient nécessaires pour conclure sur le rôle éventuel de Smad7 dans l'invasion cellulaire.

Nos résultats permettent de conclure que le TGF β endogène et exogène augmente la production de MMP-2 active. De plus, le TGF β est responsable de l'effet de la furine sur la production de la MMP-2 active. On sait que chez les cellules tumorales surexprimant la furine, l'expression de TGF β bioactif est augmentée (Dubois et al, 1995). Ce dernier stimule la production de MMP-2, de MT1-MMP et de furine. La furine augmente l'activité de la MT1-MMP ainsi produite qui active la proMMP-2. Ceci permet l'augmentation de la migration de type mésenchymale des cellules HT1080.

La production de MMP-2 est souvent associée à la formation d'invadopodes chez les cellules tumorales (Weaver, 2006 ; Ayala et al, 2006). Bien qu'il n'y ait pas d'évidences dans la littérature de l'implication directe du TGF β ou de la furine dans la formation de ces structures d'invasion, le TGF β est impliqué dans l'augmentation de l'expression de plusieurs métalloprotéases (Leivonen et al, 2002 ; McMahon et al, 2003 ; Stuelten et al, 2005), il ne serait donc pas étonnant qu'il joue un rôle dans la formation des invadopodes. De plus, le TGF β est impliqué dans la formation des podosomes (Varon et al, 2006), des structures analogues aux invadopodes, mais généralement dépourvues

d'activité protéolytique (Marx et al, 2006). Il est toutefois à noter que les podosomes des macrophages, des cellules dendritiques et des ostéoclastes possèdent une activité protéolytique similaire aux invadopodes (Yamaguchi et al, 2006 ; Yamaguchi et Condeelis, 2006). Nos résultats démontrent une formation d'invadopodes plus importante chez les CMV-TGF β qui surexpriment le TGF β de type sauvage et une inhibition de la formation de ces structures chez les CMV-TGF $\beta^{275\text{AHRA}278}$ et les CMV-PDX (figure 31). De plus, la coexpression du récepteur T β R-1^{T204D} chez les CMV-PDX entraîne un rétablissement partiel de la capacité de formation d'invadopodes par rapport aux CMV-TGF β (figure 31). Ces résultats suggèrent que la maturation du TGF β par la furine entraîne une augmentation de la formation des invadopodes et que le TGF β est du moins en partie responsable du rôle de la furine dans ce processus.

Le dernier facteur que nous avons considéré dans l'étude de l'invasion cellulaire est la motilité. Le TGF β est connu pour augmenter la motilité des cellules. L'équipe du Dr Arteaga a démontré que lorsqu'on surexprime un récepteur T β R-II dominant négatif chez des cellules de cancer du sein, on inhibe la motilité de celle-ci par un mécanisme indépendant de la voie des Smads (Dumont et al, 2003). Le laboratoire du Dr Lee a démontré que le TGF β induit la motilité des cellules de carcinome gastrique par l'augmentation de l'expression d'intégrines de la famille α_2 et α_3 par un mécanisme impliquant l'activation de la PKC δ de façon dépendante de la voie des Smads (Lee et al, 2005). La motilité ainsi induite chez ces cellules nécessite la formation de foyer d'adhésion de l'actine. L'équipe du Dr Turner a démontré la présence de paxillines à ces foyers d'adhésion, soit la paxilline α , la paxilline δ et la paxilline Hic-5 chez les

cellules épithéliales (Tumbarello et al, 2005). À la suite d'une stimulation au TGF β , on observe une augmentation de l'activité de la paxilline α et une répression de la paxilline δ , un inhibiteur de la motilité cellulaire et de la paxilline α . Toutes deux sont associées à la transition du type épithélial au type mésenchymal (Tumbarello et al, 2005). Les paxillines sont en fait impliquées dans la signalisation des intégrines et le TGF β peut induire indirectement la motilité cellulaire par la modulation de ce système.

Nos résultats obtenus dans les essais de motilité cellulaire démontrent que le TGF β augmente la motilité des cellules HT1080 de façon plus ou moins importante en fonction des concentrations utilisées (figure 18). Par contre, bien qu'une stimulation plus prolongée des cellules avec les mêmes concentrations de TGF β entraîne aussi une augmentation de la motilité cellulaire, celle-ci est beaucoup moins importante (figure 18). Ceci pourrait suggérer que les cellules se désensibilisent partiellement aux effets du TGF β exogène à la suite d'une stimulation plus soutenue. Par ailleurs, il est possible qu'une stimulation prolongée au TGF β dans un milieu sans sérum induise l'apoptose des cellules, ce qui expliquerait la diminution de la motilité. Or nous n'avons pas observé de différences dans le taux de mortalité des transfectants stables (résultat non présenté). Ceci tend à écarter l'hypothèse de l'apoptose des cellules. Un dernier facteur peut contribuer à la diminution de la motilité cellulaire à long terme. Il s'agit de l'induction d'un inhibiteur de la motilité, possiblement d'un inhibiteur de la voie de RhoA impliquée dans l'invasion amoeboïde. Il pourrait en fait s'agir d'une augmentation de l'activité de PKA qui peut phosphoryler RhoA et ainsi l'inactiver (Forget et al, 2002 ; Cardone et al, 2005) ou d'une augmentation de l'expression de p190RhoGAP qui active

RhoGDI (*RhoGDP Dissociation Inhibitor*), un inhibiteur de l'activité GTPasique des protéines Rho (Forget et al, 2002).

Nos résultats obtenus dans les essais de motilité par rétrécissement des plaies avec les transfectants stables démontrent que la maturation du TGF β par la furine entraîne une augmentation de la motilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles (figure 32). De plus, on observe une motilité réduite chez les CMV-TGF $\beta^{275\text{HARA}278}$ et les CMV-PDX par rapport à ces mêmes cellules contrôles. Enfin, la coexpression du récepteur T β R-1^{T204D} chez les CMV-PDX entraîne le rétablissement partiel de la capacité de motilité des cellules (figure 32B). Nos résultats permettent de conclure que la maturation du TGF β par la furine a un rôle promoteur sur la motilité cellulaire. De plus, les résultats obtenus avec les CMV-PDX indiquent que le TGF β est en partie responsable des effets de la furine sur la motilité cellulaire.

Certaines évidences suggèrent que les effets du TGF β sur la motilité cellulaire pourrait faire intervenir la transition entre la migration de type mésenchymal et la migration de type amoéboïde et ce, dépendamment du temps de stimulation et du type cellulaire. Chez des cellules leucémiques de rat et des cellules de carcinome humain, une stimulation brève au TGF β exogène entraîne la formation de lamellipodes associés à une migration de type amoéboïde par un mécanisme dépendant de RhoA et de cdc42, mais indépendant de la voie des Smads (Edlund et al, 2002). Chez ces mêmes cellules, une stimulation prolongée au TGF β entraîne plutôt la formation de fibres de stress, associées à une migration de type mésenchymal, par un mécanisme dépendant de p38 et des

Smads (Edlund et al, 2002). Chez les cellules de la microglie, le TGF β exogène inhibe le phénotype amoéboïde activé au profit d'un phénotype mésenchymal inactivé (Milner et Campbell, 2003). Chez les macrophages, qui adoptent une migration amoéboïde au début de leur transdifférenciation de monocyte à macrophage et ensuite une migration mésenchymale une fois totalement différenciés (Friedl, 2004), le TGF β augmente la migration à court terme par une activation de RhoA alors qu'il l'inhibe à long terme par l'activation d'inhibiteurs de RhoA, soit la PKA et le p190RhoGAP (Kim et al, 2006). Chez les cellules endothéliales vasculaires, il induit la formation de rosettes de podosomes et de lamellipodes, associés à un phénotype amoéboïde, par l'activation des voies de RhoA et PI3K (Varon et al, 2006). Par contre, on retrouve des zones de dégradations par les métalloprotéases associées à une migration mésenchymale aux sites de formation des podosomes chez ces cellules (Varon et al, 2006). Chez les fibroblastes humains, une stimulation exogène au TGF β entraîne une forme allongée de type mésenchymal des cellules par un mécanisme impliquant l'activation de Limk-2 (Vardouli et al, 2005). En fait, le TGF β active RhoA et RhoB possiblement par la voie des Smads et les protéines Rho activent ensuite Limk-2 directement ou par l'intervention de ROCK (Vardouli et al, 2005).

Nos résultats obtenus au cours des essais de morphologie sur une matrice de collagène de type IV indiquent qu'une surexpression de TGF β de type sauvage entraîne une transition vers un phénotype amoéboïde, alors que l'expression de TGF β muté au site de clivage par la furine induit plutôt un phénotype mésenchymal (figure 34). De plus, l'inhibition de la maturation des substrats de la furine par l'expression du PDX chez les

cellules HT1080 favorise le développement d'un phénotype mésenchymal. Par contre, une coexpression du récepteur T β R-1^{T204D} avec le PDX entraîne un rétablissement du phénotype amoeboïde majoritaire (figure 34). Ces résultats suggèrent que la furine est importante dans la réorganisation de l'actine permettant possiblement de former des structures de migration telles que les lamellipodes et les filipodes. Cette hypothèse est renforcée par nos résultats obtenus dans les essais de motilité. En effet, chez les CMV-TGF β ^{275AHRA278}, on ne retrouve pas de lamellipode après 12 ou 24 heures de migration alors que ces structures sont présentes chez les CMV-TGF β . Par ailleurs, le TGF β est responsable de l'effet de la furine sur le phénotype cellulaire, soit le développement d'un phénotype amoeboïde chez les cellules HT1080.

Pour compléter les résultats obtenus avec les essais de morphologie, nous avons effectué des essais d'invasion sur une matrice de collagène de type IV en inhibant l'une ou l'autre des migrations. Tel que présenté à la figure 35C, les types de migration adoptés par les transfectants stables sont cohérents avec leurs phénotypes. La surexpression du TGF β de type sauvage favorise une migration de type amoeboïde alors que les CMV-TGF β ^{275AHRA278} adoptent majoritairement une migration de type mésenchymal de la même façon que les CMV-PDX (figure 35B). La coexpression du T β R-1^{T204D} chez les CMV-PDX entraîne le retour à une migration de type amoeboïde (figure 35B). Par ailleurs, une stimulation des cellules contrôles avec du TGF β exogène entraîne une augmentation de la migration de type mésenchymal (figure 35A). On peut donc penser que l'effet du TGF β sur la migration des cellules épithéliales varie en fonction du temps de stimulation tel que démontré chez les macrophages (Kim et al,

2006). La maturation du TGF β par la furine entraînerait une migration de type mésenchymal à court terme puisqu'elle permet la relâche d'une plus forte concentration de TGF β exogène dans l'environnement tumoral. Par contre, par la suite, elle favoriserait plutôt une migration de type amoéboïde par la surexpression du TGF β dans le milieu et la stimulation continue des cellules par cette cytokine. De plus, le TGF β est responsable des effets de la furine sur le type de migration employé par les cellules tumorales.

Ces données nous permettent de suggérer que la maturation du TGF β par la furine a un effet promoteur sur le développement tumoral tardif. En effet, la migration amoéboïde est plus rapide que la migration mésenchymale (Friedl et Wolf, 2003). On peut aussi penser que ce type de migration est important dans la formation de métastases distantes dans les ganglions lymphatiques. En effet, ce type de vaisseaux n'offre pas de barrière matricielle efficace au passage des cellules tumorales puisque ceux-ci sont dépourvus de lame basale et de jonctions serrées entre les cellules endothéliales (Montell, 2003). De plus, il a été démontré que les cellules de cancer du sein entrent dans la circulation tumorale de la même façon que les lymphocytes soit par des interactions avec les récepteurs de chimiokines CXCR4 et CCR7 (Van Trappen et Pepper, 2002). Ces interactions entraînent une polymérisation de l'actine qui mène à la formation de pseudopodes associés à la migration de type amoéboïde (Van Trappen et Pepper, 2002). D'autre part, une étape clé dans la formation des métastases distantes est le processus d'extravasation. La migration amoéboïde pourrait être impliquée dans ce processus. En effet, les cellules tumorales s'échappent de la circulation sanguine en passant dans les

fenestrations des vaisseaux ou dans des lésions de ceux-ci (Deryugina et Quigley, 2006), un phénomène indépendant des métalloprotéases.

Globalement, les résultats obtenus à l'aide de nos quatre systèmes d'étude de l'invasion cellulaire suggèrent que la maturation du TGF β par la furine augmente la capacité d'invasion des cellules. En effet, elle entraîne une augmentation de la production de MMP-2 active, une augmentation de la formation d'invadopodes, une augmentation de l'adhésion et une augmentation de la motilité. Les résultats obtenus dans les essais d'invasion semblent indiquer l'inverse. Ceci peut possiblement être expliqué par les conditions expérimentales différentes. En effet, la production de MMP-2 et la formation d'invadopodes ont été étudiées sur des matrices de gélatine alors que les essais d'invasion ont été réalisés sur une matrice de collagène de type IV. Bien que la MMP-2 et la MMP-9 puissent dégrader le collagène, leur principal substrat est la gélatine (Mazzieri et al, 1997). Elles seront donc plus efficaces dans la dégradation de la gélatine que du collagène de type IV. Le collagène est mieux dégradé par la MMP-1, la MMP-8 et la MMP-13, les collagénases (Deryugina et Quigley, 2006). On peut donc penser que les CMV-TGF β inhibe la migration de façon dépendante du substrat, soit la migration sur une matrice de collagène, alors qu'il l'augmente sur d'autres substrats. Cette hypothèse a été vérifiée dans un essai d'invasion préliminaire sur une matrice de gélatine. Dans ce système, les CMV-TGF β ont effectivement une migration accrue par rapport aux cellules contrôles (résultats non présentés). En somme, la maturation du TGF β par la furine permettrait aux cellules de mieux adhérer à la matrice extracellulaire et ainsi de mieux interagir avec celle-ci. Ensuite, les cellules pourraient produire des

invadopodes et de la MMP-2 active pour dégrader la matrice et débiter une invasion mésenchymale. Dans les conditions où les inhibiteurs des métalloprotéases commencent à être exprimés et/ou que la migration mésenchymale est inhibée, les cellules pourraient utiliser une migration de type amoeboïde afin de traverser la matrice. Par conséquent, la maturation du TGF β par la furine pourrait permettre aux cellules d'acquérir une plasticité dans le type de migration utilisé afin de s'adapter aux conditions environnementales et/ou de compenser pour la perte de certaines abilités de locomotion. En fait, nos données indiquent que le TGF β peut faciliter la migration mésenchymale par la production de MMP-2 active et la formation d'invadopodes ou la migration amoeboïde par l'augmentation de l'adhésion et de la motilité des cellules. Il est toutefois à noter que d'autres substrats de la furine peuvent être nécessaires pour augmenter l'adhésion cellulaire (figure 29) et collaborer avec le TGF β au niveau de la formation des invadopodes (figure 31B) et de la motilité cellulaire (figure 32C).

Afin de confirmer ces résultats, nous pourrions mieux caractériser les voies de signalisation impliquées dans le processus de migration cellulaire. De plus, il serait intéressant de réaliser un essai d'invasion en trois dimensions dans un bloc de Matrigel contenant du collagène de type IV et de la gélatine. Ce système permet d'étudier plusieurs forces impliquées dans la migration telles que l'astringence du milieu, l'encombrement stérique et les interactions entre les cellules et entre les cellules et la matrice (Zaman et al, 2006). Ce type de modèle simule donc de façon plus étroite les types de contraintes encourus par les cellules dans l'environnement *in vivo*, ce qui permettrait de mieux définir l'impact global du TGF β et de la furine dans la migration

tumorale. De plus, un modèle d'induction de métastases *in vivo* pourrait être réalisé puis comparé à notre modèle de progression tumorale en ce qui a trait à la formation de métastases. Le modèle d'induction de métastase permet d'étudier spécifiquement l'extravasation qui semble impliquer la migration amoéboïde (Deryugina et Quigley, 2006) et qui constitue une étape clé dans le processus métastatique, alors que le modèle de progression tumorale fait intervenir les deux types de migration à travers les processus d'invasion tumorale, d'intravasation et d'extravasation. En comparant les deux modèles, on pourrait mieux définir les facteurs impliqués, principalement au niveau des types de migration employés, dans la formation des métastases chez nos transfectants stables.

À la suite de l'invasion des cellules tumorales, la dernière étape de la tumorigénèse est la formation de métastases et l'angiogénèse. Le TGF β est impliqué dans l'angiogénèse, mais son rôle n'est pas clairement défini. Il peut par exemple stimuler l'angiogénèse en stabilisant les vaisseaux sanguins ou l'inhiber en augmentant l'expression des TIMPs et en inhibant l'expression des activateurs du plasminogène (Distler et al, 2003). Plusieurs études documentent les effets contradictoires sur les effets du TGF β dans l'angiogénèse. L'équipe du Dr Pouyssegur a démontré que le TGF β peut induire la survie des cellules endothéliales par la voie de PI3K et en collaboration avec l'EGF et le TGF α dont il stimule la synthèse (Viñals et Pouyssegur, 2001). Par contre, l'équipe du Dr Stockinger a démontré que le TGF β peut induire l'apoptose des cellules endothéliales par un mécanisme peu défini mais faisait intervenir un complexe entre CD87 et CD222 (Leksa et al, 2005). D'autre part, on sait que le VEGF est un important acteur dans

l'angiogénèse. L'équipe du Dr Bernabéu a démontré que le TGF β peut induire l'expression de VEGF par une synergie d'action entre le complexe Smad3 :Smad4 et le facteur HIF-1 α (Sánchez-Elsner et al, 2001). Par contre, l'équipe du Dr Pepper a démontré que le TGF β peut inhiber les effets du VEGF à des concentrations de l'ordre des ng/ml en diminuant l'expression du VEGFR-2 (Mandriota et al, 1996).

Les résultats obtenus par PCR quantitatif en temps réel suggèrent que la maturation du TGF β par la furine est nécessaire pour stimuler la production de facteurs angiogéniques (figure 23). En effet, on observe une augmentation de l'expression du facteur pro-angiogénique VEGF, un facteur de croissance des vaisseaux sanguins, chez les CMV-TGF β (figure 23c). On observe également une augmentation de l'expression de la furine chez ce transfectant (figure 23b). La furine est impliquée dans l'activation de la MT1-MMP (Sato et al, 1996). L'expression de cette dernière est également augmentée chez les CMV-TGF β (figure 23d). De plus, la MT1-MMP semble activée chez les CMV-TGF β tel que démontré par nos résultats obtenus en zymographie qui indiquent une augmentation de l'activation de la MMP-2 chez ce transfectant (figure 30). Les métalloprotéases sont importantes dans le processus d'angiogénèse puisqu'elles contribuent au remodelage de la matrice extracellulaire (Distler et al, 2003). Par conséquent, ces résultats suggèrent que la maturation du TGF β par la furine augmente l'angiogénèse en favorisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par l'expression du VEGF et en permettant le remodelage de la matrice extracellulaire par l'action de la MMP-2. Par contre, les résultats obtenus en PCR quantitatif en temps réel indiquent également une forte expression de PAI-1, un inhibiteur du système du

plasminogène, chez les CMV-TGF β . Ceci suppose une importante diminution de l'expression de la plasmine impliquée dans l'angiogénèse au niveau du remodelage de la matrice extracellulaire et de la déposition de la fibrine (Vassalli et al, 1991). Par conséquent, bien que la majeure partie de nos résultats semblent indiquer une augmentation de l'angiogénèse en présence de maturation du TGF β par la furine, des études plus poussées seront nécessaires afin de trancher sur son rôle exact dans ce processus. Nous pourrions évaluer les effets du TGF β sur les cellules endothéliales à l'aide d'une coculture de cellules HT1080 et de cellules endothéliales telles que les HUVEC. De plus, il serait important d'effectuer des marquages en immunohistochimie pour le CD31, l'ALK-1 et l'endogline sur les coupes des tumeurs obtenues dans notre modèle de progression tumorale. Il serait également pertinent de vérifier l'expression et la localisation du facteur de transcription HIF-1 α . Ce facteur est induit dans les conditions hypoxiques et peut stimuler l'expression du VEGF pour favoriser la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Ryan et al, 1998 ; Frantz et al, 2005). Enfin, la présence de métastases pourrait être vérifiée dans les poumons et le foie des souris injectées par un marquage en immunohistochimie au Ki-67, un marqueur de la prolifération cellulaire. Dans le cas où des métastases seraient présentes, les mêmes marquages que ceux effectués chez les tumeurs pourraient y être réalisés. Ceci permettrait de vérifier si la maturation du TGF β par la furine a les mêmes effets sur l'angiogénèse au début et à la fin du processus tumoral ou si ces effets sont modulés en fonction du stade tumoral atteint.

5. Conclusion

L'intérêt principal de ce projet était de mieux caractériser le rôle de la maturation du TGF β par la furine dans la tumorigénèse. Pour y parvenir, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de cellules de fibrosarcome humain et un modèle *in vivo* de progression tumorale chez des souris nu/nu. À partir de notre modèle cellulaire, nous avons mis au point des transfectants stables exprimant les différents transgènes nécessaires à l'étude. Nous avons ensuite démontré l'importance de la maturation du TGF β par la furine dans plusieurs étapes de la carcinogénèse.

Nous suggérons que la maturation du TGF β par la furine aurait un effet protecteur sur le développement précoce des tumeurs. Dans un premier temps, nous avons démontré par incorporation de thymidine que cette maturation, en permettant de conserver des concentrations élevées de TGF β dans l'environnement tumoral, inhibe la prolifération des cellules tumorales. Nous avons confirmé ces observations avec notre modèle de progression tumorale qui illustre clairement que chez les transfectants stables pour la forme mutée du TGF β au site de maturation par la furine, les tumeurs croissent plus rapidement que chez les cellules contrôles et les CMV-TGF β qui surexpriment la forme sauvage du TGF β pouvant être maturée par la furine.

Par la suite, nous suggérons que la maturation du TGF β par la furine a un rôle promoteur sur l'invasion cellulaire par cinq techniques, soit les essais d'adhésion, les essais d'invasion sur matrice de collagène, les zymographies, la formation d'invadopodes et les essais de motilité cellulaire. Nous avons en fait démontré que le TGF β mature promeut la migration de type amoéboïde, dépendante de la voie RhoA, en stimulant l'adhésion, la motilité et la formation de lamellipodes chez les cellules HT1080 et la migration mésenchymale en augmentant la production de MMP-2 active et la formation d'invadopodes. Or la migration de type mésenchymal est d'une importance capitale pour les processus d'intravasation, alors que la migration amoéboïde semble impliqué dans l'extravasation. Par conséquent, la présence de TGF β mature dans l'environnement a un effet promoteur sur la suite de la progression tumorale puisqu'il facilite la formation des métastases. Des études *in vivo* seront toutefois nécessaires pour confirmer ces résultats.

Nous n'avons pas pu déterminer avec précision le rôle de la maturation du TGF β par la furine dans le processus de l'angiogénèse. Nous avons étudié par PCR quantitatif en temps réel et par zymographie différents facteurs impliqués dans ce processus. Nous avons démontré que la présence de TGF β bioactif pourrait avoir un effet facilitateur sur l'angiogénèse en induisant l'expression de la furine et du VEGF, l'activation de la MT1-MMP et la maturation de la MMP-2. Par ailleurs, nous avons aussi démontré qu'il peut réprimer ce processus en induisant l'expression de PAI-1. Des études *in vitro* complémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre le rôle exact de la maturation du TGF β par la furine à ce niveau. De plus, les données obtenues *in vitro*

devront être confirmées *in vivo* dans un modèle de progression tumorale et dans un modèle d'induction de métastases.

Enfin, les essais de reconstitution de l'activité du TGF β chez les cellules dont la furine est inhibée indiquent que le TGF β est grandement responsable des effets de la furine dans la tumorigénèse. Il est impliqué autant dans l'invasion que dans la prolifération à ce niveau. Toutefois, d'autres substrats de la furine sont probablement nécessaires à la formation des invadopodes, à la motilité et à l'adhésion cellulaire. On peut penser que tous ces substrats agissent en collaboration pour faciliter la progression tumorale.

En somme, ce projet permet de mieux comprendre l'importance de l'interaction entre le TGF β et la furine dans la tumorigénèse. En comprenant mieux les interactions entre les différents acteurs impliqués dans cette physiopathologie, nous serons davantage en mesure de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Il serait donc important de poursuivre ce type d'études avec d'autres substrats de la furine impliqués dans la tumorigénèse tels que le PDGF et les intégrines afin d'obtenir une vue d'ensemble des impacts de cette convertase de proprotéines dans la progression tumorale.

6. Remerciements

Je tiens d'abord à remercier ma directrice, Dre Claire Dubois, pour sa patience et le temps qu'elle m'a accordé au cours de mon stage et de ma maîtrise ainsi que pour ses judicieux conseils. J'ai grandement apprécié sa rigueur, sa détermination et son enthousiasme. Je la remercie de m'avoir permis de développer davantage mon caractère et ma confiance.

Je remercie sincèrement les membres du jury, Dre Nathalie Perreault, Dr André Cantin et Dre Claire Dubois de m'avoir accordé de leur temps pour corriger mon mémoire et pour leurs conseils qui m'ont permis d'améliorer le produit final.

Je remercie Mme Francine Grondin pour le soutien technique qu'elle m'a apporté au cours de ma maîtrise. Je la remercie également pour sa bonne humeur et son écoute qui m'ont été très précieuses. Je remercie également les principaux membres du laboratoire, Martine Charbonneau, pour son expertise sur la formation d'invadopodes, et Dominique Arseneault, pour sa contribution au modèle *in vivo*.

Je remercie les laboratoires de Dr Subburaj Ilangumaran, Dr Patrick McDonald, Dr Robert Day, Dr Jean-Luc Parent, Dre Nathalie Rivard et Dr Artur de Brum-Fernandes

pour le prêt de matériel et d'équipements qui m'ont été indispensables au cours de ma maîtrise.

Je remercie les professeurs du département, les secrétaires et le personnel de soutien pour leur excellent travail. Un merci particulier à M. Léonid Volkov pour ses précieux conseils et ses explications d'une grande clarté sur la microscopie.

Un merci tout spécial à mes amis, Philippe Dufort, Hugues Allard-Chamard, François Chabot, Milène Vandal, Igor Shvets et Jonathan Vermette, pour leur soutien moral qui m'a été indispensable pour mener à bien ma maîtrise. Je remercie plus particulièrement Caroline Valiquette pour son encouragement, ses judicieux conseils grammaticaux et le temps qu'elle m'a accordé.

Je remercie du fond du coeur mes parents, mon frère et mes grands-parents pour leurs encouragements tout au long de ces études qui m'ont incitée à poursuivre malgré tout.

7. Références

- Abrami, L. et van Der Goot, F.G. (1999) Plasma membrane microdomains act as concentration platforms to facilitate intoxication by aerolysin. *J Cell Biol* **147**, 175-84.
- Adams, R.H., Lohrum, M., Klostermann, A., Betz, H. et Puschel, A.W. (1997) The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *EMBO J* **16**, 6077-86.
- Afrakhte, M., Moren, A., Jossan, S., Itoh, S., Sampath, K., Westermarck, B., Heldin, C.H., Heldin, N.E. et ten Dijke, P. (1998) Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGFbeta family members. *Biochem Biophys Res Commun* **249**, 505-11.
- Albini, A., Benelli, R., Noonan, D.M. et Brigati, C. (2004) The "chemoinvasion assay": a tool to study tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. *Int J Dev Biol* **48**, 563-71.
- Anderson, E.D., Molloy, S.S., Jean, F., Fei, H., Shimamura, S. et Thomas, G. (2002) The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *J Biol Chem* **277**, 12879-90.
- Andl, C.D., Fargnoli, B.B., Okawa, T., Bowser, M., Takaoka, M., Nakagawa, H., Klein-Szanto, A., Hua, X., Herlyn, M. et Rustgi, A.K. (2006) Coordinated functions of E-cadherin and transforming growth factor beta receptor II in vitro and in vivo. *Cancer Res* **66**, 9878-85.
- Anzano, M.A., Roberts, A.B., Meyers, C.A., Komoriya, A., Lamb, L.C., Smith, J.M. et Sporn, M.B. (1982a) Synergistic interaction of two classes of transforming growth factors from murine sarcoma cells. *Cancer Res* **42**, 4776-8.
- Anzano, M.A., Roberts, A.B., Smith, J.M., Lamb, L.C. et Sporn, M.B. (1982b) Purification by reverse-phase high-performance liquid chromatography of an epidermal growth factor-dependent transforming growth factor. *Anal Biochem* **125**, 217-24.
- Armulik, A., Abramsson, A. et Betsholtz, C. (2005) Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* **97**, 512-23.
- Arteaga, C.L. (2006) Inhibition of TGFbeta signaling in cancer therapy. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 30-7.

- Asano, Y., Ihn, H., Yamane, K., Jinnin, M., Mimura, Y. et Tamaki, K. (2005) Involvement of α 5 β 1 integrin-mediated activation of latent transforming growth factor β 1 in autocrine transforming growth factor β signaling in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum* **52**, 2897-905.
- Ayala, I., Baldassarre, M., Caldieri, G. et Buccione, R. (2006) Invadopodia: a guided tour. *Eur J Cell Biol* **85**, 159-64.
- Bachman, K.E. et Park, B.H. (2005) Dual nature of TGF β signaling: tumor suppressor vs. tumor promoter. *Curr Opin Oncol* **17**, 49-54.
- Bai, S. et Cao, X. (2002) A nuclear antagonistic mechanism of inhibitory Smads in transforming growth factor- β signaling. *J Biol Chem* **277**, 4176-82.
- Bailey, S.M. et Murnane, J.P. (2006) Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Res* **34**, 2408-17.
- Bakin, A.V., Rinehart, C., Tomlinson, A.K. et Arteaga, C.L. (2002) p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGF β -mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci* **115**, 3193-206.
- Bakin, A.V., Tomlinson, A.K., Bhowmick, N.A., Moses, H.L. et Arteaga, C.L. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor β -mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* **275**, 36803-10.
- Baldassarre, M., Ayala, I., Beznoussenko, G., Giacchetti, G., Machesky, L.M., Luini, A. et Buccione, R. (2006) Actin dynamics at sites of extracellular matrix degradation. *Eur J Cell Biol* **85**, 1217-31.
- Bandyopadhyay, A., Agyin, J.K., Wang, L., Tang, Y., Lei, X., Story, B.M., Cornell, J.E., Pollock, B.H., Mundy, G.R. et Sun, L.Z. (2006) Inhibition of pulmonary and skeletal metastasis by a transforming growth factor- β type I receptor kinase inhibitor. *Cancer Res* **66**, 6714-21.
- Barcellos-Hoff, M.H. et Dix, T.A. (1996) Redox-mediated activation of latent transforming growth factor- β 1. *Mol Endocrinol* **10**, 1077-83.
- Bassi, D.E., Fu, J., Lopez de Cicco, R. et Klein-Szanto, A.J. (2005) Proprotein convertases: "master switches" in the regulation of tumor growth and progression. *Mol Carcinog* **44**, 151-61.
- Bassi, D.E., Lopez De Cicco, R., Mahloogi, H., Zucker, S., Thomas, G. et Klein-Szanto, A.J. (2001a) Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 10326-31.

- Bassi, D.E., Mahloogi, H., Al-Saleem, L., Lopez De Cicco, R., Ridge, J.A. et Klein-Szanto, A.J. (2001b) Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. *Mol Carcinog* **31**, 224-32.
- Bassi, D.E., Mahloogi, H. et Klein-Szanto, A.J. (2000) The proprotein convertases furin and PACE4 play a significant role in tumor progression. *Mol Carcinog* **28**, 63-9.
- Bassi, D.E., Mahloogi, H., Lopez De Cicco, R. et Klein-Szanto, A. (2003) Increased furin activity enhances the malignant phenotype of human head and neck cancer cells. *Am J Pathol* **162**, 439-47.
- Belkin, A.M., Akimov, S.S., Zaritskaya, L.S., Ratnikov, B.I., Deryugina, E.I. et Strongin, A.Y. (2001) Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem* **276**, 18415-22.
- Benjannet, S., Rhainds, D., Hamelin, J., Nassoury, N. et Seidah, N.G. (2006) The proprotein convertase PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: Functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *J Biol Chem*
- Bertolino, P., Deckers, M., Lebrin, F. et ten Dijke, P. (2005) Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest* **128**, 585S-590S.
- Blanchette, F., Day, R., Dong, W., Laprise, M.H. et Dubois, C.M. (1997) TGFbeta1 regulates gene expression of its own converting enzyme furin. *J Clin Invest* **99**, 1974-83.
- Blanchette, F., Rivard, N., Rudd, P., Grondin, F., Attisano, L. et Dubois, C.M. (2001a) Cross-talk between the p42/p44 MAP kinase and Smad pathways in transforming growth factor beta 1-induced furin gene transactivation. *J Biol Chem* **276**, 33986-94.
- Blanchette, F., Rudd, P., Grondin, F., Attisano, L. et Dubois, C.M. (2001b) Involvement of Smads in TGFbeta1-induced furin (fur) transcription. *J Cell Physiol* **188**, 264-73.
- Blobe, G.C., Schiemann, W.P. et Lodish, H.F. (2000) Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* **342**, 1350-8.
- Borges, E., Jan, Y. et Ruoslahti, E. (2000) Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain. *J Biol Chem* **275**, 39867-73.

- Bornstein, P. (2001) Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest* **107**, 929-34.
- Boudreau, N., Sympton, C.J., Werb, Z. et Bissell, M.J. (1995) Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* **267**, 891-3.
- Bravo, D.A., Gleason, J.B., Sanchez, R.I., Roth, R.A. et Fuller, R.S. (1994) Accurate and efficient cleavage of the human insulin proreceptor by the human proprotein-processing protease furin. Characterization and kinetic parameters using the purified, secreted soluble protease expressed by a recombinant baculovirus. *J Biol Chem* **269**, 25830-7.
- Brennan, S.O. et Nakayama, K. (1994) Furin has the proalbumin substrate specificity and serpin inhibitory properties of an in situ hepatic convertase. *FEBS Lett* **338**, 147-51.
- Brodin, G., Ahgren, A., ten Dijke, P., Heldin, C.H. et Heuchel, R. (2000) Efficient TGFbeta induction of the Smad7 gene requires cooperation between AP-1, Sp1, and Smad proteins on the mouse Smad7 promoter. *J Biol Chem* **275**, 29023-30.
- Brunner, A.M., Gentry, L.E., Cooper, J.A. et Purchio, A.F. (1988) Recombinant type 1 transforming growth factor beta precursor produced in Chinese hamster ovary cells is glycosylated and phosphorylated. *Mol Cell Biol* **8**, 2229-32.
- Brunner, A.M., Marquardt, H., Malacko, A.R., Lioubin, M.N. et Purchio, A.F. (1989) Site-directed mutagenesis of cysteine residues in the pro region of the transforming growth factor beta 1 precursor. Expression and characterization of mutant proteins. *J Biol Chem* **264**, 13660-4.
- Cai, G., Chen, X., Fu, B. et Lu, Y. (2005) Activation of gelatinases by fibrin is PA/plasmin system-dependent in human glomerular endothelial cells. *Mol Cell Biochem* **277**, 171-9.
- Caldas, C. (1998) Molecular assessment of cancer. *BMJ* **316**, 1360-3.
- Cambier, S., Gline, S., Mu, D., Collins, R., Araya, J., Dolganov, G., Einheber, S., Boudreau, N. et Nishimura, S.L. (2005) Integrin alpha(v)beta8-mediated activation of transforming growth factor-beta by perivascular astrocytes: an angiogenic control switch. *Am J Pathol* **166**, 1883-94.
- Cao, J., Rehemtulla, A., Pavlaki, M., Kozarekar, P. et Chiarelli, C. (2005a) Furin directly cleaves proMMP-2 in the trans-Golgi network resulting in a nonfunctioning proteinase. *J Biol Chem* **280**, 10974-80.
- Cao, Y., Li, C.Y., Moeller, B.J., Yu, D., Zhao, Y., Dreher, M.R., Shan, S. et Dewhirst,

- M.W. (2005b) Observation of incipient tumor angiogenesis that is independent of hypoxia and hypoxia inducible factor-1 activation. *Cancer Res* **65**, 5498-505.
- Cardone, R.A., Bagorda, A., Bellizzi, A., Busco, G., Guerra, L., Paradiso, A., Casavola, V., Zaccolo, M. et Reshkin, S.J. (2005) Protein kinase A gating of a pseudopodial-located RhoA/ROCK/p38/NHE1 signal module regulates invasion in breast cancer cell lines. *Mol Biol Cell* **16**, 3117-27.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C.J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R.K., Collen, D. et Keshert, E. (1998) Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **394**, 485-90.
- Carragher, N.O., Walker, S.M., Scott Carragher, L.A., Harris, F., Sawyer, T.K., Brunton, V.G., Ozanne, B.W. et Frame, M.C. (2006) Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and amoeboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function. *Oncogene* **25**, 5726-40.
- Cavallaro, U., Schaffhauser, B. et Christofori, G. (2002) Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett* **176**, 123-8.
- Cavanagh, D., Davis, P.J., Pappin, D.J., Binns, M.M., Boursnell, M.E. et Brown, T.D. (1986) Coronavirus IBV: partial amino terminal sequencing of spike polypeptide S2 identifies the sequence Arg-Arg-Phe-Arg-Arg at the cleavage site of the spike precursor polypeptide of IBV strains Beaudette and M41. *Virus Res* **4**, 133-43.
- Chang, H., Brown, C.W. et Matzuk, M.M. (2002) Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* **23**, 787-823.
- Cheifetz, S., Ling, N., Guillemin, R. et Massague, J. (1988) A surface component on GH3 pituitary cells that recognizes transforming growth factor-beta, activin, and inhibin. *J Biol Chem* **263**, 17225-8.
- Chen, W.T. et Wang, J.Y. (1999) Specialized surface protrusions of invasive cells, invadopodia and lamellipodia, have differential MT1-MMP, MMP-2, and TIMP-2 localization. *Ann N Y Acad Sci* **878**, 361-71.
- Chen, Y.G. et Meng, A.M. (2004) Negative regulation of TGF β signaling in development. *Cell Res* **14**, 441-9.
- Cho, S.J., Kang, M.J., Homer, R.J., Kang, H.R., Zhang, X., Lee, P.J., Elias, J.A. et Lee, C.G. (2006) Role of early growth response-1 (Egr-1) in interleukin-13-induced inflammation and remodeling. *J Biol Chem* **281**, 8161-8.

- Christensen, C., Ambartsumian, N., Gilestro, G., Thomsen, B., Comoglio, P., Tamagnone, L., Guldberg, P. et Lukanidin, E. (2005) Proteolytic processing converts the repelling signal Sema3E into an inducer of invasive growth and lung metastasis. *Cancer Res* **65**, 6167-77.
- Christofori, G. (2003) Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. *EMBO J* **22**, 2318-23.
- Coffey, R.J. Jr, Sipes, N.J., Bascom, C.C., Graves-Deal, R., Pennington, C.Y., Weissman, B.E. et Moses, H.L. (1988) Growth modulation of mouse keratinocytes by transforming growth factors. *Cancer Res* **48**, 1596-602.
- Collins, P.L., Huang, Y.T. et Wertz, G.W. (1984) Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7683-7.
- Couzin, J. (2003) Medicine. Tracing the steps of metastasis, cancer's menacing ballet. *Science* **299**, 1002-6.
- Cui, Y., Jean, F., Thomas, G. et Christian, J.L. (1998) BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J* **17**, 4735-43.
- Darlington, G.J., Kelly, J.H. et Buffone, G.J. (1987) Growth and hepatospecific gene expression of human hepatoma cells in a defined medium. *In Vitro Cell Dev Biol* **23**, 349-54.
- Davis, G.E., Pinter Allen, K.A., Salazar, R. et Maxwell, S.A. (2001) Matrix metalloproteinase-1 and -9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices. *J Cell Sci* **114**, 917-30.
- de Caestecker, M. (2004) The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**, 1-11.
- de Larco, J.E. et Todaro, G.J. (1978) Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 4001-5.
- Decroly, E., Vandenbranden, M., Ruysschaë Jr., J.-M., Cogniaux, J., Jacob, G. S., Howard, S. C., Marshall, G., Kompelli, A., Basak, A., Jean, F., Lazure, C., Benjannet, S., Chretien, M., Day, R. et Seidah, N.G. (1994) The convertases furin and PC1 can both cleave the human immunodeficiency virus (HIV)-1 envelope glycoprotein gp160 into gp120 (HIV-1 SU) and gp41 (HIV-1 TM). *J Biol Chem* **269**, 12240-7.
- Demou, Z.N., Awad, M., McKee, T., Perentes, J.Y., Wang, X., Munn, L.L., Jain, R.K. et

- Boucher, Y. (2005) Lack of telopeptides in fibrillar collagen I promotes the invasion of a metastatic breast tumor cell line. *Cancer Res* **65**, 5674-82.
- Deng, S.J., Bickett, D.M., Mitchell, J.L., Lambert, M.H., Blackburn, R.K., Carter, H.L. 3rd, Neugebauer, J., Pahel, G., Weiner, M.P. et Moss, M.L. (2000) Substrate specificity of human collagenase 3 assessed using a phage-displayed peptide library. *J Biol Chem* **275**, 31422-7.
- Derycke, L.D. et Bracke, M.E. (2004) N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol* **48**, 463-76.
- Derynck, R. et Zhang, Y.E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGFbeta family signalling. *Nature* **425**, 577-84.
- Deryugina, E.I. et Quigley, J.P. (2006) Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **25**, 9-34.
- Deryugina, E.I., Ratnikov, B.I., Postnova, T.I., Rozanov, D.V. et Strongin, A.Y. (2002) Processing of integrin alpha(v) subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* **277**, 9749-56.
- Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F. et Wrana, J.L. (2003) Distinct endocytic pathways regulate TGFbeta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* **5**, 410-21.
- Distler, J.H., Hirth, A., Kurowska-Stolarska, M., Gay, R.E., Gay, S. et Distler, O. (2003) Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* **47**, 149-61.
- Dong, Z., Kumar, R., Yang, X. et Fidler, I.J. (1997) Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* **88**, 801-10.
- Drews, R., Paleyanda, R.K., Lee, T.K., Chang, R.R., Rehemtulla, A., Kaufman, R.J., Drohan, W.N. et Lubon, H. (1995) Proteolytic maturation of protein C upon engineering the mouse mammary gland to express furin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10462-6.
- Dubois, C.M., Blanchette, F., Laprise, M.H., Leduc, R., Grondin, F. et Seidah, N.G. (2001) Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. *Am J Pathol* **158**, 305-16.
- Dubois, C.M., Laprise, M.H., Blanchette, F., Gentry, L.E. et Leduc, R. (1995)

Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* **270**, 10618-24.

- Dubois, C.M., Ruscetti, F.W., Palaszynski, E.W., Falk, L.A., Oppenheim, J.J. et Keller, J.R. (1990) Transforming growth factor beta is a potent inhibitor of interleukin 1 (IL-1) receptor expression: proposed mechanism of inhibition of IL-1 action. *J Exp Med* **172**, 737-44.
- Dubois, C.M., Ruscetti, F.W., Stankova, J. et Keller, J.R. (1994) Transforming growth factor-beta regulates c-kit message stability and cell-surface protein expression in hematopoietic progenitors. *Blood* **83**, 3138-45.
- Dumont, N., Bakin, A.V. et Arteaga, C.L. (2003) Autocrine transforming growth factor-beta signaling mediates Smad-independent motility in human cancer cells. *J Biol Chem* **278**, 3275-85.
- Duprey, P. et Paulin, D. (1995) What can be learned from intermediate filament gene regulation in the mouse embryo. *Int J Dev Biol* **39**, 443-57.
- Eckes, B., Dogic, D., Colucci-Guyon, E., Wang, N., Maniotis, A., Ingber, D., Merckling, A., Langa, F., Aumailley, M., Delougee, A., Koteliensky, V., Babinet, C. et Krieg, T. (1998) Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci* **111** (Pt 13), 1897-907.
- Edlund, S., Landstrom, M., Heldin, C.H. et Aspenstrom, P. (2002) Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol Biol Cell* **13**, 902-14.
- Edlund, S., Lee, S.Y., Grimsby, S., Zhang, S., Aspenstrom, P., Heldin, C.H. et Landstrom, M. (2005) Interaction between Smad7 and beta-catenin: importance for transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **25**, 1475-88.
- Eickelberg, O., Centrella, M., Reiss, M., Kashgarian, M. et Wells, R.G. (2002) Betaglycan inhibits TGFbeta signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *J Biol Chem* **277**, 823-9.
- Engel, M.E., McDonnell, M.A., Law, B.K. et Moses, H.L. (1999) Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem* **274**, 37413-20.
- Fakhrai, H., Dorigo, O., Shawler, D.L., Lin, H., Mercola, D., Black, K.L., Royston, I. et Sobol, R.E. (1996) Eradication of established intracranial rat gliomas by transforming growth factor beta antisense gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2909-14.

- Feng, X.H. et Derynck, R. (2005) Specificity and versatility in TGFbeta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 659-93.
- Feng, X.H., Liang, Y.Y., Liang, M., Zhai, W. et Lin, X. (2002) Direct interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGFbeta-mediated induction of the CDK inhibitor p15(Ink4B). *Mol Cell* **9**, 133-43.
- Fiore, E., Fusco, C., Romero, P. et Stamenkovic, I. (2002) Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Oncogene* **21**, 5213-23.
- Fleisch, M.C., Maxwell, C.A. et Barcellos-Hoff, M.H. (2006) The pleiotropic roles of transforming growth factor beta in homeostasis and carcinogenesis of endocrine organs. *Endocr Relat Cancer* **13**, 379-400.
- Fontana, L., Chen, Y., Prijatelj, P., Sakai, T., Fassler, R., Sakai, L.Y. et Rifkin, D.B. (2005) Fibronectin is required for integrin alphavbeta6-mediated activation of latent TGFbeta complexes containing LTBP-1. *FASEB J* **19**, 1798-808.
- Forget, M.A., Desrosiers, R.R., Gingras, D. et Beliveau, R. (2002) Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes. *Biochem J* **361**, 243-54.
- Fortunel, N.O., Hatzfeld, A. et Hatzfeld, J.A. (2000) Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* **96**, 2022-36.
- Fowlkes, J.L., Enghild, J.J., Suzuki, K. et Nagase, H. (1994) Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem* **269**, 25742-6.
- Franke, W.W., Grund, C., Kuhn, C., Jackson, B.W. et Illmensee, K. (1982) Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. *Differentiation* **23**, 43-59.
- Frantz, S., Vincent, K.A., Feron, O. et Kelly, R.A. (2005) Innate immunity and angiogenesis. *Circ Res* **96**, 15-26.
- Frederick, J.P., Liberati, N.T., Waddell, D.S., Shi, Y. et Wang, X.F. (2004) Transforming growth factor beta-mediated transcriptional repression of c-myc is dependent on direct binding of Smad3 to a novel repressive Smad binding element. *Mol Cell Biol* **24**, 2546-59.
- Friedl, P. (2004) Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 14-23.

- Friedl, P. et Wolf, K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**, 362-74.
- Friese, M.A., Wischhusen, J., Wick, W., Weiler, M., Eisele, G., Steinle, A. et Weller, M. (2004) RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* **64**, 7596-603.
- Frolik, C.A., Dart, L.L., Meyers, C.A., Smith, D.M. et Sporn, M.B. (1983) Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3676-80.
- Frolik, C.A., Wakefield, L.M., Smith, D.M. et Sporn, M.B. (1984) Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor-beta in normal rat kidney fibroblasts. *J Biol Chem* **259**, 10995-1000.
- Fugere, M. et Day, R. (2005) Cutting back on pro-protein convertases: the latest approaches to pharmacological inhibition. *Trends Pharmacol Sci* **26**, 294-301.
- Fukai, F., Ohtaki, M., Fujii, N., Yajima, H., Ishii, T., Nishizawa, Y., Miyazaki, K. et Katayama, T. (1995) Release of biological activities from quiescent fibronectin by a conformational change and limited proteolysis by matrix metalloproteinases. *Biochemistry* **34**, 11453-9.
- Fukui, Y. (2002) Mechanistics of amoeboid locomotion: signal to forces. *Cell Biol Int* **26**, 933-44.
- Fukui, Y., de Hostos, E., Yumura, S., Kitanishi-Yumura, T. et Inoué (1999) Architectural dynamics of F-actin in eupodia suggests their role in invasive locomotion in Dictyostelium. *Exp Cell Res* **249**, 33-45.
- Fukui, Y., de Hostos, E.L. et Inoué, S. (1997) Dynamics of GFP-coronin and eupodia in live Dictyostelium observed with real-time confocal optics. *Biol Bull* **193**, 224-5.
- Fukui, Y. et Inoué, S. (1997) Amoeboid movement anchored by eupodia, new actin-rich knobby feet in Dictyostelium. *Cell Motil Cytoskeleton* **36**, 339-54.
- Fuster, M.M. et Esko, J.D. (2005) The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* **5**, 526-42.
- Garred, O., Dubinina, E., Holm, P.K., Olsnes, S., van Deurs, B., Kozlov, J.V. et Sandvig, K. (1995) Role of processing and intracellular transport for optimal toxicity of Shiga toxin and toxin mutants. *Exp Cell Res* **218**, 39-49.

- Geiger, B., Volberg, T., Ginsberg, D., Bitzur, S., Sabanay, I. et Hynes, R.O. (1990) Broad spectrum pan-cadherin antibodies, reactive with the C-terminal 24 amino acid residues of N-cadherin. *J Cell Sci* **97** (Pt 4), 607-14.
- Gentry, L.E., Lioubin, M.N., Purchio, A.F. et Marquardt, H. (1988) Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Mol Cell Biol* **8**, 4162-8.
- Ghiringhelli, F., Menard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P.E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., Lecesne, A., Robert, C., Blay, J.Y., Bernard, J., Caillat-Zucman, S., Freitas, A., Tursz, T., Wagner-Ballon, O., Capron, C., Vainchenker, W., Martin, F. et Zitvogel, L. (2005) CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* **202**, 1075-85.
- Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W.G. et Quaranta, V. (1997) Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* **277**, 225-8.
- Gleizes, P.E., Munger, J.S., Nunes, I., Harpel, J.G., Mazzieri, R., Noguera, I. et Rifkin, D.B. (1997) TGFbeta latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells* **15**, 190-7.
- Gong, R., Rifai, A. et Dworkin, L.D. (2005) Activation of PI3K-Akt-GSK3beta pathway mediates hepatocyte growth factor inhibition of RANTES expression in renal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **330**, 27-33.
- Good, R.A. (1972) Relations between immunity and malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 1026-32.
- Gordon, V.M., Benz, R., Fujii, K., Leppla, S.H. et Tweten, R.K. (1997) Clostridium septicum alpha-toxin is proteolytically activated by furin. *Infect Immun* **65**, 4130-4.
- Gotzmann, J., Fischer, A.N., Zojer, M., Mikula, M., Proell, V., Huber, H., Jechlinger, M., Waerner, T., Weith, A., Beug, H. et Mikulits, W. (2006) A crucial function of PDGF in TGFbeta-mediated cancer progression of hepatocytes. *Oncogene* **25**, 3170-85.
- Gotzmann, J., Huber, H., Thallinger, C., Wolschek, M., Jansen, B., Schulte-Hermann, R., Beug, H. et Mikulits, W. (2002) Hepatocytes convert to a fibroblastoid phenotype through the cooperation of TGFbeta1 and Ha-Ras: steps towards invasiveness. *J Cell Sci* **115**, 1189-202.
- Gougos, A. et Letarte, M. (1988) Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J*

- Goumans, M.J., Lebrin, F. et Valdimarsdottir, G. (2003a) Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF β receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* **13**, 301-7.
- Goumans, M.J. et Mummery, C. (2000) Functional analysis of the TGF β receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol* **44**, 253-65.
- Goumans, M.J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Lebrin, F., Larsson, J., Mummery, C., Karlsson, S. et ten Dijke, P. (2003b) Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGF β /ALK5 signaling. *Mol Cell* **12**, 817-28.
- Goumans, M.J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P. et ten Dijke, P. (2002) Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF β type I receptors. *EMBO J* **21**, 1743-53.
- Grady, W.M., Willis, J.E., Trobridge, P., Romero-Gallo, J., Munoz, N., Olechnowicz, J., Ferguson, K., Gautam, S. et Markowitz, S.D. (2006) Proliferation and Cdk4 expression in microsatellite unstable colon cancers with TGFBR2 mutations. *Int J Cancer* **118**, 600-8.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. et Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74.
- Green, M. (1972) Molecular basis for the attack on cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 1036-41.
- Guney, I. et Sedivy, J.M. (2006) Cellular senescence, epigenetic switches and c-Myc. *Cell Cycle* **5**, 2319-23.
- Guo, W. et Giancotti, F.G. (2004) Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 816-26.
- Gupta, S., Plattner, R., Der, C.J. et Stanbridge, E.J. (2000) Dissection of Ras-dependent signaling pathways controlling aggressive tumor growth of human fibrosarcoma cells: evidence for a potential novel pathway. *Mol Cell Biol* **20**, 9294-306.
- Gupta, S. et Stanbridge, E.J. (2001) Paired human fibrosarcoma cell lines that possess or lack endogenous mutant N-ras alleles as experimental model for Ras signaling pathways. *Methods Enzymol* **333**, 290-306.
- Gupta, S., Stuffrein, S., Plattner, R., Tencati, M., Gray, C., Whang, Y.E. et Stanbridge, E.J. (2001) Role of phosphoinositide 3-kinase in the aggressive tumor growth of

- HT1080 human fibrosarcoma cells. *Mol Cell Biol* **21**, 5846-56.
- Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.D. et Garten, W. (1992) Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**, 358-61.
- Hashimoto, G., Inoki, I., Fujii, Y., Aoki, T., Ikeda, E. et Okada, Y. (2002) Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165. *J Biol Chem* **277**, 36288-95.
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A. Jr, Wrana, J.L. et Falb, D. (1997) The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* **89**, 1165-73.
- Hegerfeldt, Y., Tusch, M., Brocker, E.B. et Friedl, P. (2002) Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res* **62**, 2125-30.
- Hellmig, S., Vollenberg, S., Goebeler-Kolve, M.E., Fischbach, W., Hampe, J., Folsch, U.R. et Schreiber, S. (2004) IL-1 gene cluster polymorphisms and development of primary gastric B-cell lymphoma in Helicobacter pylori infection. *Blood* **104**, 2994-5.
- Hendy, G.N., Bennett, H.P., Gibbs, B.F., Lazure, C., Day, R. et Seidah, N.G. (1995) Parathyroid hormone is preferentially cleaved to parathyroid hormone by the prohormone convertase furin. A mass spectrometric study. *J Biol Chem* **270**, 9517-25.
- Henrich, S., Cameron, A., Bourenkov, G.P., Kiefersauer, R., Huber, R., Lindberg, I., Bode, W. et Than, M.E. (2003) The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol* **10**, 520-6.
- Higaki, M. et Shimokado, K. (1999) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for growth factor-induced amino acid uptake by vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 2127-32.
- Hiraga, T., Myoui, A., Choi, M.E., Yoshikawa, H. et Yoneda, T. (2006) Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor-beta enhances bone metastases in breast cancer. *Cancer Res* **66**, 2067-73.
- Hocevar, B.A., Brown, T.L. et Howe, P.H. (1999) TGFbeta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J* **18**, 1345-56.

- Hocevar, B.A., Smine, A., Xu, X.X. et Howe, P.H. (2001) The adaptor molecule Disabled-2 links the transforming growth factor beta receptors to the Smad pathway. *EMBO J* **20**, 2789-801.
- Holley, R.W. (1975) Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature* **258**, 487-90.
- Holliday, L.S., Welgus, H.G., Fliszar, C.J., Veith, G.M., Jeffrey, J.J. et Gluck, S.L. (1997) Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. *J Biol Chem* **272**, 22053-8.
- Howe, P.H., Draetta, G. et Leof, E.B. (1991) Transforming growth factor beta 1 inhibition of p34cdc2 phosphorylation and histone H1 kinase activity is associated with G1/S-phase growth arrest. *Mol Cell Biol* **11**, 1185-94.
- Hu, K., Yang, J., Tanaka, S., Gonias, S.L., Mars, W.M. et Liu, Y. (2006) Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J Biol Chem* **281**, 2120-7.
- Hua, X., Miller, Z.A., Benchabane, H., Wrana, J.L. et Lodish, H.F. (2000) Synergism between transcription factors TFE3 and Smad3 in transforming growth factor-beta-induced transcription of the Smad7 gene. *J Biol Chem* **275**, 33205-8.
- Huang, S.S. et Huang, J.S. (2005) TGFbeta control of cell proliferation. *J Cell Biochem* **96**, 447-62.
- Huang, S.S., Zhou, M., Johnson, F.E., Shieh, H.S. et Huang, J.S. (1999) An active site of transforming growth factor-beta(1) for growth inhibition and stimulation. *J Biol Chem* **274**, 27754-8.
- Huber, M.A., Kraut, N. et Beug, H. (2005) Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 548-58.
- Huse, M., Muir, T.W., Xu, L., Chen, Y.G., Kuriyan, J. et Massague, J. (2001) The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Mol Cell* **8**, 671-82.
- Imai, K., Hiramatsu, A., Fukushima, D., Pierschbacher, M.D. et Okada, Y. (1997) Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J* **322** (Pt 3), 809-14.
- Ito, A., Mukaiyama, A., Itoh, Y., Nagase, H., Thogersen, I.B., Enghild, J.J., Sasaguri, Y. et Mori, Y. (1996) Degradation of interleukin 1beta by matrix

- metalloproteinases. *J Biol Chem* **271**, 14657-60.
- Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M.J. et Ten Dijke, P. (2000) Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* **267**, 6954-67.
- Itoh, S., Landstrom, M., Hermansson, A., Itoh, F., Heldin, C.H., Heldin, N.E. et ten Dijke, P. (1998) Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J Biol Chem* **273**, 29195-201.
- Jager, D., Jager, E., Bert, F. et Knuth, A. (2001) Cellular and humoral immune responses of cancer patients to defined tumor antigens. *Cancer Chemother Biol Response Modif* **19**, 385-93.
- Jakowlew, S.B. (2006) Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*
- Jansen, S., Stefan, C., Creemers, J.W., Waelkens, E., Van Eynde, A., Stalmans, W. et Bollen, M. (2005) Proteolytic maturation and activation of autotaxin (NPP2), a secreted metastasis-enhancing lysophospholipase D. *J Cell Sci* **118**, 3081-9.
- Javelaud, D. et Mauviel, A. (2004) [Transforming growth factor-betas: smad signaling and roles in physiopathology]. *Pathol Biol (Paris)* **52**, 50-4.
- Jechlinger, M., Grunert, S., Tamir, I.H., Janda, E., Ludemann, S., Waerner, T., Seither, P., Weith, A., Beug, H. et Kraut, N. (2003) Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. *Oncogene* **22**, 7155-69.
- Kadono, Y., Shibahara, K., Namiki, M., Watanabe, Y., Seiki, M. et Sato, H. (1998) Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in the formation of hepatocyte growth factor/scatter factor-induced branching tubules in madin-darby canine kidney epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 681-7.
- Kahata, K., Hayashi, M., Asaka, M., Hellman, U., Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Kato, S., Imamura, T. et Miyazono, K. (2004) Regulation of transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein signalling by transcriptional coactivator GCN5. *Genes Cells* **9**, 143-51.
- Kajita, M., Itoh, Y., Chiba, T., Mori, H., Okada, A., Kinoh, H. et Seiki, M. (2001) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* **153**, 893-904.
- Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K. et Kimura, N. (2004) Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci* **95**, 377-84.

- Keeton, M.R., Curriden, S.A., van Zonneveld, A.J. et Loskutoff, D.J. (1991) Identification of regulatory sequences in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene responsive to transforming growth factor beta. *J Biol Chem* **266**, 23048-52.
- Kessler, E., Takahara, K., Biniaminov, L., Brusel, M. et Greenspan, D.S. (1996) Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science* **271**, 360-2.
- Khalil, N., Xu, Y.D., O'Connor, R. et Duronio, V. (2005) Proliferation of pulmonary interstitial fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta1-induced release of extracellular fibroblast growth factor-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK. *J Biol Chem* **280**, 43000-9.
- Kidd, P. (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* **8**, 223-46.
- Kim, J.S., Kim, J.G., Moon, M.Y., Jeon, C.Y., Won, H.Y., Kim, H.J., Jeon, Y.J., Seo, J.Y., Kim, J.I., Kim, J., Lee, J.Y., Kim, P.H. et Park, J.B. (2006) Transforming growth factor-beta1 regulates macrophage migration via RhoA. *Blood* **108**, 1821-9.
- Klimpel, K.R., Molloy, S.S., Thomas, G. et Leppla, S.H. (1992) Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10277-81.
- Koinuma, D., Shinozaki, M., Komuro, A., Goto, K., Saitoh, M., Hanyu, A., Ebina, M., Nukiwa, T., Miyazawa, K., Imamura, T. et Miyazono, K. (2003) Arkadia amplifies TGFbeta superfamily signalling through degradation of Smad7. *EMBO J* **22**, 6458-70.
- Korsching, E., Packeisen, J., Liedtke, C., Hungermann, D., Wulfig, P., van Diest, P.J., Brandt, B., Boecker, W. et Buerger, H. (2005) The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J Pathol* **206**, 451-7.
- Koshikawa, N., Giannelli, G., Cirulli, V., Miyazaki, K. et Quaranta, V. (2000) Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol* **148**, 615-24.
- Kozyraki, R., Kristiansen, M., Silahatoglu, A., Hansen, C., Jacobsen, C., Tommerup, N., Verroust, P.J. et Moestrup, S.K. (1998) The human intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin: molecular characterization and chromosomal mapping of the gene to 10p within the autosomal recessive megaloblastic anemia (MGA1)

region. *Blood* **91**, 3593-600.

- Krakowski, A.R., Laboureau, J., Mauviel, A., Bissell, M.J. et Luo, K. (2005) Cytoplasmic SnoN in normal tissues and nonmalignant cells antagonizes TGFbeta signaling by sequestration of the Smad proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12437-42.
- Kreiger, N., Ashbury, F.D., Purdue, M.P. et Marrett, L.D. (2003) Workshop report: environmental exposures and cancer prevention. *Environ Health Perspect* **111**, 105-8.
- Krekoski, C.A., Neubauer, D., Graham, J.B. et Muir, D. (2002) Metalloproteinase-dependent predegeneration in vitro enhances axonal regeneration within acellular peripheral nerve grafts. *J Neurosci* **22**, 10408-15.
- Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. et Massague, J. (1999) A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* **13**, 804-16.
- Kubota, S., Fridman, R. et Yamada, Y. (1991) Transforming growth factor-beta suppresses the invasiveness of human fibrosarcoma cells in vitro by increasing expression of tissue inhibitor of metalloprotease. *Biochem Biophys Res Commun* **176**, 129-36.
- Kwak, H.J., Park, M.J., Cho, H., Park, C.M., Moon, S.I., Lee, H.C., Park, I.C., Kim, M.S., Rhee, C.H. et Hong, S.I. (2006) Transforming growth factor-beta1 induces tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression via activation of extracellular signal-regulated kinase and Sp1 in human fibrosarcoma cells. *Mol Cancer Res* **4**, 209-20.
- Larsson, O., Zetterberg, A. et Engstrom, W. (1985) Cell-cycle-specific induction of quiescence achieved by limited inhibition of protein synthesis: counteractive effect of addition of purified growth factors. *J Cell Sci* **73**, 375-87.
- Laurie, G.W., Leblond, C.P. et Martin, G.R. (1982) Localization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, and fibronectin to the basal lamina of basement membranes. *J Cell Biol* **95**, 340-4.
- Leask, A. et Abraham, D.J. (2004) TGFbeta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* **18**, 816-27.
- Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P. et Ten Dijke, P. (2005) TGFbeta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* **65**, 599-608.
- Leduc, R., Molloy, S.S., Thorne, B.A. et Thomas, G. (1992) Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic

cleavage. *J Biol Chem* **267**, 14304-8.

- Lee, B.H., Bae, J.S., Park, R.W., Kim, J.E., Park, J.Y. et Kim, I.S. (2006) betaig-h3 triggers signaling pathways mediating adhesion and migration of vascular smooth muscle cells through alphavbeta5 integrin. *Exp Mol Med* **38**, 153-61.
- Lee, C.G., Homer, R.J., Zhu, Z., Lanone, S., Wang, X., Koteliansky, V., Shipley, J.M., Gotwals, P., Noble, P., Chen, Q., Senior, R.M. et Elias, J.A. (2001) Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med* **194**, 809-21.
- Lee, K.Y. et Bae, S.C. (2002) TGFbeta-dependent cell growth arrest and apoptosis. *J Biochem Mol Biol* **35**, 47-53.
- Lee, M.H. et Murphy, G. (2004) Matrix metalloproteinases at a glance. *J Cell Sci* **117**, 4015-6.
- Lee, M.S., Kim, T.Y., Kim, Y.B., Lee, S.Y., Ko, S.G., Jong, H.S., Kim, T.Y., Bang, Y.J. et Lee, J.W. (2005) The signaling network of transforming growth factor beta1, protein kinase Cdelta, and integrin underlies the spreading and invasiveness of gastric carcinoma cells. *Mol Cell Biol* **25**, 6921-36.
- Lehmann, M., Rigot, V., Seidah, N.G., Marvaldi, J. et Lissitzky, J.C. (1996) Lack of integrin alpha-chain endoproteolytic cleavage in furin-deficient human colon adenocarcinoma cells LoVo. *Biochem J* **317** (Pt 3), 803-9.
- Lei, H., Furth, E.E., Kalluri, R., Chiou, T., Tilly, K.I., Tilly, J.L., Elkon, K.B., Jeffrey, J.J. et Strauss, J.F. 3rd (1996) A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor. *J Clin Invest* **98**, 1971-8.
- Leivonen, S.K., Ala-Aho, R., Koli, K., Grenman, R., Peltonen, J. et Kahari, V.M. (2006) Activation of Smad signaling enhances collagenase-3 (MMP-13) expression and invasion of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene* **25**, 2588-600.
- Leivonen, S.K., Chantry, A., Hakkinen, L., Han, J. et Kahari, V.M. (2002) Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression in human gingival fibroblasts. Evidence for cross-talk between Smad3 and p38 signaling pathways. *J Biol Chem* **277**, 46338-46.
- Leksa, V., Godar, S., Schiller, H.B., Fuerbauer, E., Muhammad, A., Slezakova, K., Horejsi, V., Steinlein, P., Weidle, U.H., Binder, B.R. et Stockinger, H. (2005) TGFbeta-induced apoptosis in endothelial cells mediated by M6P/IGFII-R and mini-plasminogen. *J Cell Sci* **118**, 4577-86.

- Lemaire, I. et Ouellet, S. (1996) Distinctive profile of alveolar macrophage-derived cytokine release induced by fibrogenic and nonfibrogenic mineral dusts. *J Toxicol Environ Health* **47**, 465-78.
- Leong, G.M., Subramaniam, N., Figueroa, J., Flanagan, J.L., Hayman, M.J., Eisman, J.A. et Kouzmenko, A.P. (2001) Ski-interacting protein interacts with Smad proteins to augment transforming growth factor-beta-dependent transcription. *J Biol Chem* **276**, 18243-8.
- Letterio, J.J. (2005) TGFbeta signaling in T cells: roles in lymphoid and epithelial neoplasia. *Oncogene* **24**, 5701-12.
- Levy, L. et Hill, C.S. (2005) Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor {beta} (TGF{beta}) target genes and distinguishes TGF{beta}-induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses. *Mol Cell Biol* **25**, 8108-25.
- Lhuillier, L. et Dryer, S.E. (2002) Developmental regulation of neuronal K(Ca) channels by TGFbeta1: an essential role for PI3 kinase signaling and membrane insertion. *J Neurophysiol* **88**, 954-64.
- Li, A.G., Wang, D., Feng, X.H. et Wang, X.J. (2004) Latent TGFbeta1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder. *EMBO J* **23**, 1770-81.
- Li, G., Satyamoorthy, K. et Herlyn, M. (2002) Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. *Crit Rev Oral Biol Med* **13**, 62-70.
- Li, H., Xu, D., Li, J., Berndt, M.C. et Liu, J.P. (2006a) Transforming growth factor beta suppresses human telomerase reverse transcriptase (hTERT) by Smad3 interactions with c-Myc and the hTERT gene. *J Biol Chem* **281**, 25588-600.
- Li, X., Deng, W., Nail, C.D., Bailey, S.K., Kraus, M.H., Ruppert, J.M. et Lobo-Ruppert, S.M. (2006b) Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene* **25**, 609-21.
- Lijnen, H.R., Van Hoef, B., Lupu, F., Moons, L., Carmeliet, P. et Collen, D. (1998) Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 1035-45.
- Lim, J.Y., Park, S.J., Hwang, H.Y., Park, E.J., Nam, J.H., Kim, J. et Park, S.I. (2005) TGFbeta1 induces cardiac hypertrophic responses via PKC-dependent ATF-2 activation. *J Mol Cell Cardiol* **39**, 627-36.

- Lin, H.C., Chang, J.H., Jain, S., Gabison, E.E., Kure, T., Kato, T., Fukai, N. et Azar, D.T. (2001) Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 2517-24.
- Liotta, L.A. et Kohn, E. (2004) Anoikis: cancer and the homeless cell. *Nature* **430**, 973-4.
- Lissitzky, J.C., Luis, J., Munzer, J.S., Benjannet, S., Parat, F., Chretien, M., Marvaldi, J. et Seidah, N.G. (2000) Endoproteolytic processing of integrin pro-alpha subunits involves the redundant function of furin and proprotein convertase (PC) 5A, but not paired basic amino acid converting enzyme (PACE) 4, PC5B or PC7. *Biochem J* **346 Pt 1**, 133-8.
- Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z. et Bissell, M.J. (1997) Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* **139**, 1861-72.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G. et Israel, A. (1998) The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8108-12.
- Lopez de Cicco, R., Watson, J.C., Bassi, D.E., Litwin, S. et Klein-Szanto, A.J. (2004) Simultaneous expression of furin and vascular endothelial growth factor in human oral tongue squamous cell carcinoma progression. *Clin Cancer Res* **10**, 4480-8.
- Lu, S.L., Reh, D., Li, A.G., Woods, J., Corless, C.L., Kulesz-Martin, M. et Wang, X.J. (2004) Overexpression of transforming growth factor beta1 in head and neck epithelia results in inflammation, angiogenesis, and epithelial hyperproliferation. *Cancer Res* **64**, 4405-10.
- Lu, Z., Lam, K.S., Wang, N., Xu, X., Cortes, M. et Andersen, B. (2006) LMO4 can interact with Smad proteins and modulate transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells. *Oncogene* **25**, 2920-30.
- Luscinskas, F.W. et Lawler, J. (1994) Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB J* **8**, 929-38.
- Lux, A., Beil, C., Majety, M., Barron, S., Gallione, C.J., Kuhn, H.M., Berg, J.N., Kioschis, P., Marchuk, D.A. et Hafner, M. (2005) Human retroviral gag- and gag-pol-like proteins interact with the transforming growth factor-beta receptor activin receptor-like kinase 1. *J Biol Chem* **280**, 8482-93.
- Malemud, C.J. (2006) Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* **11**, 1696-701.

- Mandriota, S.J., Menoud, P.A. et Pepper, M.S. (1996) Transforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelial growth factor receptor 2/flk-1 expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **271**, 11500-5.
- Manes, S., Mira, E., Barbacid, M.M., Cipres, A., Fernandez-Resa, P., Buesa, J.M., Merida, I., Aracil, M., Marquez, G. et Martinez-A, C. (1997) Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J Biol Chem* **272**, 25706-12.
- Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M. et Rudensky, A.Y. (2005) TGFbeta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* **201**, 1061-7.
- Martin, S.S. et Vuori, K. (2004) Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis. *Biochim Biophys Acta* **1692**, 145-57.
- Marx, J. (2006) Cell biology. Podosomes and invadopodia help mobile cells step lively. *Science* **312**, 1868-9.
- Massague, J. (2000) How cells read TGFbeta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 169-78.
- Massague, J., Seoane, J. et Wotton, D. (2005) Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**, 2783-810.
- Matsuyoshi, N. et Imamura, S. (1997) Multiple cadherins are expressed in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 355-8.
- Mayer, G., Boileau, G. et Bendayan, M. (2003) Furin interacts with proMT1-MMP and integrin alphaV at specialized domains of renal cell plasma membrane. *J Cell Sci* **116**, 1763-73.
- Mazzieri, R., Masiero, L., Zanetta, L., Monea, S., Onisto, M., Garbisa, S. et Mignatti, P. (1997) Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J* **16**, 2319-32.
- McMahon, S., Laprise, M.H. et Dubois, C.M. (2003) Alternative pathway for the role of furin in tumor cell invasion process. Enhanced MMP-2 levels through bioactive TGFbeta. *Exp Cell Res* **291**, 326-39.
- McQuibban, G.A., Gong, J.H., Tam, E.M., McCulloch, C.A., Clark-Lewis, I. et Overall, C.M. (2000) Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* **289**, 1202-6.
- McQuibban, G.A., Gong, J.H., Wong, J.P., Wallace, J.L., Clark-Lewis, I. et Overall, C.M. (2002) Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant

- proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* **100**, 1160-7.
- Medici, D., Hay, E.D. et Goodenough, D.A. (2006) Cooperation between snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGFbeta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* **17**, 1871-9.
- Melnick, R.L., Huff, J., Barrett, J.C., Maronpot, R.R., Lucier, G. et Portier, C.J. (1993) Cell proliferation and chemical carcinogenesis: a symposium overview. *Mol Carcinog* **7**, 135-8.
- Mercapide, J., Lopez De Cicco, R., Bassi, D.E., Castresana, J.S., Thomas, G. et Klein-Szanto, A.J. (2002) Inhibition of furin-mediated processing results in suppression of astrocytoma cell growth and invasiveness. *Clin Cancer Res* **8**, 1740-6.
- Milewicz, D.M., Grossfield, J., Cao, S.N., Kielty, C., Covitz, W. et Jewett, T. (1995) A mutation in FBN1 disrupts profibrillin processing and results in isolated skeletal features of the Marfan syndrome. *J Clin Invest* **95**, 2373-8.
- Milner, R. et Campbell, I.L. (2003) The extracellular matrix and cytokines regulate microglial integrin expression and activation. *J Immunol* **170**, 3850-8.
- Misumi, Y., Oda, K., Fujiwara, T., Takami, N., Tashiro, K. et Ikehara, Y. (1991) Functional expression of furin demonstrating its intracellular localization and endoprotease activity for processing of proalbumin and complement pro-C3. *J Biol Chem* **266**, 16954-9.
- Mitchell, E.J., Lee, K. et O'Connor-McCourt, M.D. (1992) Characterization of transforming growth factor-beta (TGFbeta) receptors on BeWo choriocarcinoma cells including the identification of a novel 38-kDa TGFbeta binding glycoprotein. *Mol Biol Cell* **3**, 1295-307.
- Miyazono, K., Hellman, U., Wernstedt, C. et Heldin, C.H. (1988) Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem* **263**, 6407-15.
- Moehring, J.M., Inocencio, N.M., Robertson, B.J. et Moehring, T.J. (1993) Expression of mouse furin in a Chinese hamster cell resistant to Pseudomonas exotoxin A and viruses complements the genetic lesion. *J Biol Chem* **268**, 2590-4.
- Molloy, S.S., Anderson, E.D., Jean, F. et Thomas, G. (1999) Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol* **9**, 28-35.
- Molloy, S.S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimpel, K.R. et Thomas, G. (1992)

Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem* **267**, 16396-402.

- Molloy, S.S., Thomas, L., VanSlyke, J.K., Stenberg, P.E. et Thomas, G. (1994) Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J* **13**, 18-33.
- Mondino, A., Giordano, S. et Comoglio, P.M. (1991) Defective posttranslational processing activates the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor). *Mol Cell Biol* **11**, 6084-92.
- Montell, D. (2003) Metastasis movies, macrophages, molecules and more. Conference on Mechanisms of Invasion and Metastasis. *EMBO Rep* **4**, 458-62.
- Mori, S., Matsuzaki, K., Yoshida, K., Furukawa, F., Tahashi, Y., Yamagata, H., Sekimoto, G., Seki, T., Matsui, H., Nishizawa, M., Fujisawa, J. and Okazaki, K. (2004) TGFbeta et HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene* **23**, 7416-29.
- Moustakas, A. et Heldin, C.H. (2005) Non-Smad TGFbeta signals. *J Cell Sci* **118**, 3573-84.
- Moustakas, A. et Stournaras, C. (1999) Regulation of actin organisation by TGF-beta in H-ras-transformed fibroblasts. *J Cell Sci* **112** (Pt 8), 1169-79.
- Moustakas, A., Takumi, T., Lin, H.Y. et Lodish, H.F. (1995) GH3 pituitary tumor cells contain heteromeric type I and type II receptor complexes for transforming growth factor beta and activin-A. *J Biol Chem* **270**, 765-9.
- Muraoka-Cook, R.S., Dumont, N. et Arteaga, C.L. (2005) Dual role of transforming growth factor beta in mammary tumorigenesis and metastatic progression. *Clin Cancer Res* **11**, 937s-43s.
- Murphy, S.J., Dore, J.J., Edens, M., Coffey, R.J., Barnard, J.A., Mitchell, H., Wilkes, M. et Leof, E.B. (2004) Differential trafficking of transforming growth factor-beta receptors and ligand in polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell* **15**, 2853-62.
- Nakahara, H., Howard, L., Thompson, E.W., Sato, H., Seiki, M., Yeh, Y. et Chen, W.T. (1997) Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7959-64.
- Nakamura, H., Mukai, M., Komatsu, K., Tanaka-Okamoto, M., Itoh, Y., Ishizaki, H., Tatsuta, M., Inoue, M. et Miyoshi, J. (2005) Transforming growth factor-beta1 induces LMO7 while enhancing the invasiveness of rat ascites hepatoma cells.

Cancer Lett **220**, 95-9.

- Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H. et ten Dijke, P. (1997) Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGFbeta signalling. *Nature* **389**, 631-5.
- Navarro-Garcia, F., Sears, C., Eslava, C., Cravioto, A. et Nataro, J.P. (1999) Cytoskeletal effects induced by pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative Escherichia coli. *Infect Immun* **67**, 2184-92.
- Noe, V., Fingleton, B., Jacobs, K., Crawford, H.C., Vermeulen, S., Steelant, W., Bruyneel, E., Matrisian, L.M. et Mareel, M. (2001) Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* **114**, 111-118.
- Nyberg, P., Moilanen, M., Paju, A., Sarin, A., Stenman, U.H., Sorsa, T. et Salo, T. (2002) MMP-9 activation by tumor trypsin-2 enhances in vivo invasion of human tongue carcinoma cells. *J Dent Res* **81**, 831-5.
- O'Grady, P., Kuo, M.D., Baldassare, J.J., Huang, S.S. et Huang, J.S. (1991) Purification of a new type high molecular weight receptor (type V receptor) of transforming growth factor beta (TGFbeta) from bovine liver. Identification of the type V TGFbeta receptor in cultured cells. *J Biol Chem* **266**, 8583-9.
- Ogata, M., Chaudhary, V.K., Pastan, I. et FitzGerald, D.J. (1990) Processing of Pseudomonas exotoxin by a cellular protease results in the generation of a 37,000-Da toxin fragment that is translocated to the cytosol. *J Biol Chem* **265**, 20678-85.
- Ogston, D. (1980) Biochemistry of the plasmin system. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* **14**, 5-9.
- Ohashi, N., Yamamoto, T., Uchida, C., Togawa, A., Fukasawa, H., Fujigaki, Y., Suzuki, S., Kitagawa, K., Hattori, T., Oda, T., Hayashi, H., Hishida, A. et Kitagawa, M. (2005) Transcriptional induction of Smurf2 ubiquitin ligase by TGFbeta. *FEBS Lett* **579**, 2557-63.
- Ohgushi, M., Kuroki, S., Fukamachi, H., O'Reilly, L.A., Kuida, K., Strasser, A. et Yonehara, S. (2005) Transforming growth factor beta-dependent sequential activation of Smad, Bim, and caspase-9 mediates physiological apoptosis in gastric epithelial cells. *Mol Cell Biol* **25**, 10017-28.
- Ohishi, I. (1987) Activation of botulinum C2 toxin by trypsin. *Infect Immun* **55**, 1461-5.

- Omer, F.M., de Souza, J.B., Corran, P.H., Sultan, A.A. et Riley, E.M. (2003) Activation of transforming growth factor beta by malaria parasite-derived metalloproteinases and a thrombospondin-like molecule. *J Exp Med* **198**, 1817-27.
- Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J. et Niehrs, C. (1999) Silencing of TGFbeta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* **401**, 480-5.
- Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.R., Zhang, Y. et Wrana, J.L. (2005) Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* **307**, 1603-9.
- Pan, J.J., Chang, W.J., Barone, T.A., Plunkett, R.J., Ostrow, P.T. et Greenberg, S.J. (2006) Increased expression of TGFbeta1 reduces tumor growth of human U-87 Glioblastoma Cells in vivo. *Cancer Immunol Immunother* **55**, 918-27.
- Pardali, K. et Moustakas, A. (2006) Actions of TGFbeta as tumor suppressor and prometastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta*
- Pasche, B. (2001) Role of transforming growth factor beta in cancer. *J Cell Physiol* **186**, 153-68.
- Patil, S., Wildey, G.M., Brown, T.L., Choy, L., Derynck, R. et Howe, P.H. (2000) Smad7 is induced by CD40 and protects WEHI 231 B-lymphocytes from transforming growth factor-beta -induced growth inhibition and apoptosis. *J Biol Chem* **275**, 38363-70.
- Patrick, D.L., Ferketich, S.L., Frame, P.S., Harris, J.J., Hendricks, C.B., Levin, B., Link, M.P., Lustig, C., McLaughlin, J., Ried, L.D., Turrisi, A.T. 3rd, Unutzer, J. et Vernon, S.W. (2003) National Institutes of Health State-of-the-Science Conference Statement: Symptom Management in Cancer: Pain, Depression, and Fatigue, July 15-17, 2002. *J Natl Cancer Inst* **95**, 1110-7.
- Patterson, B.C. et Sang, Q.A. (1997) Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem* **272**, 28823-5.
- Pece-Barbara, N., Vera, S., Kathirkamathamby, K., Liebner, S., Di Guglielmo, G.M., Dejana, E., Wrana, J.L. et Letarte, M. (2005) Endoglin null endothelial cells proliferate faster and are more responsive to transforming growth factor beta1 with higher affinity receptors and an activated Alk1 pathway. *J Biol Chem* **280**, 27800-8.
- Pei, D. et Weiss, S.J. (1995) Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* **375**, 244-7.

- Peinado, H., Marin, F., Cubillo, E., Stark, H.J., Fusenig, N., Nieto, M.A. et Cano, A. (2004) Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J Cell Sci* **117**, 2827-39.
- Peinado, H., Quintanilla, M. et Cano, A. (2003) Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* **278**, 21113-23.
- Pellett, O.L., Smith, M.L., Greene, A.A. et Schneider, J.A. (1988) Lack of complementation in somatic cell hybrids between fibroblasts from patients with different forms of cystinosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3531-4.
- Petruzzelli, L., Takami, M. et Humes, H.D. (1999) Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med* **106**, 467-76.
- Pilcher, B.K., Dumin, J.A., Sudbeck, B.D., Krane, S.M., Welgus, H.G. et Parks, W.C. (1997) The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol* **137**, 1445-57.
- Pinzani, M. et Marra, F. (2001) Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* **21**, 397-416.
- Plow, E.F., Herren, T., Redlitz, A., Miles, L.A. et Hoover-Plow, J.L. (1995) The cell biology of the plasminogen system. *FASEB J* **9**, 939-45.
- Pociask, D.A., Sime, P.J. et Brody, A.R. (2004) Asbestos-derived reactive oxygen species activate TGFbeta1. *Lab Invest* **84**, 1013-23.
- Posthaus, H., Dubois, C.M. et Muller, E. (2003) Novel insights into cadherin processing by subtilisin-like convertases. *FEBS Lett* **536**, 203-8.
- Postigo, A.A., Depp, J.L., Taylor, J.J. et Kroll, K.L. (2003) Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J* **22**, 2453-62.
- Potter, E., Bergwitz, C. et Brabant, G. (1999) The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. *Endocr Rev* **20**, 207-39.
- Powell, W.C., Fingleton, B., Wilson, C.L., Boothby, M. et Matrisian, L.M. (1999) The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol* **9**, 1441-7.
- Quackenbush, E.J. et Letarte, M. (1985) Identification of several cell surface proteins of non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies. *J Immunol* **134**, 1276-85.

- Ratnikov, B.I., Rozanov, D.V., Postnova, T.I., Baci, P.G., Zhang, H., DiScipio, R.G., Chestukhina, G.G., Smith, J.W., Deryugina, E.I. et Strongin, A.Y. (2002) An alternative processing of integrin $\alpha(v)$ subunit in tumor cells by membrane type-1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* **277**, 7377-85.
- Rees, J.R., Onwuegbusi, B.A., Save, V.E., Alderson, D. et Fitzgerald, R.C. (2006) In vivo and In vitro Evidence for Transforming Growth Factor- β 1-Mediated Epithelial to Mesenchymal Transition in Esophageal Adenocarcinoma. *Cancer Res* **66**, 9583-90.
- Rice, C.M., Lenches, E.M., Eddy, S.R., Shin, S.J., Sheets, R.L. et Strauss, J.H. (1985) Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* **229**, 726-33.
- Rich, J.N., Zhang, M., Datto, M.B., Bigner, D.D. et Wang, X.F. (1999) Transforming growth factor- β -mediated p15(INK4B) induction and growth inhibition in astrocytes is SMAD3-dependent and a pathway prominently altered in human glioma cell lines. *J Biol Chem* **274**, 35053-8.
- Richard, D.E., Berra, E. et Pouyssegur, J. (1999) Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* **266**, 718-22.
- Richardson, C., Hull, D., Greer, P., Hasel, K., Berkovich, A., Englund, G., Bellini, W., Rima, B. et Lazzarini, R. (1986) The nucleotide sequence of the mRNA encoding the fusion protein of measles virus (Edmonston strain): a comparison of fusion proteins from several different paramyxoviruses. *Virology* **155**, 508-23.
- Roberts, A.B., Anzano, M.A., Lamb, L.C., Smith, J.M. et Sporn, M.B. (1981) New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 5339-43.
- Roberts, A.B. et Wakefield, L.M. (2003) The two faces of transforming growth factor β in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8621-3.
- Robson, C.N., Gnanapragasam, V., Byrne, R.L., Collins, A.T. et Neal, D.E. (1999) Transforming growth factor- β 1 up-regulates p15, p21 and p27 and blocks cell cycling in G1 in human prostate epithelium. *J Endocrinol* **160**, 257-66.
- Roebroek, A.J., Schalken, J.A., Leunissen, J.A., Onnekink, C., Bloemers, H.P. et Van de Ven, W.J. (1986) Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *EMBO J* **5**, 2197-202.
- Ruegg, C. (2006) Leukocytes, inflammation, and angiogenesis in cancer: fatal attractions. *J Leukoc Biol*

- Ruscetti, F.W., Akel, S. et Bartelmez, S.H. (2005) Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context. *Oncogene* **24**, 5751-63.
- Ryan, H.E., Lo, J. et Johnson, R.S. (1998) HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* **17**, 3005-15.
- Sahai, E. et Marshall, C.J. (2003) Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* **5**, 711-9.
- Saharinen, J., Taipale, J. et Keski-Oja, J. (1996) Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *EMBO J* **15**, 245-53.
- Samuel, J.E. et Gordon, V.M. (1994) Evidence that proteolytic separation of Shiga-like toxin type IIv A subunit into A1 and A2 subunits is not required for toxin activity. *J Biol Chem* **269**, 4853-9.
- Sanchez-Elsner, T., Botella, L.M., Velasco, B., Corbi, A., Attisano, L. et Bernabeu, C. (2001) Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem* **276**, 38527-35.
- Sanchez-Elsner, T., Botella, L.M., Velasco, B., Langa, C. et Bernabeu, C. (2002) Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* **277**, 43799-808.
- Sanchez, S., Sayas, C.L., Lim, F., Diaz-Nido, J., Avila, J. et Wandosell, F. (2001) The inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase induces neurite retraction and activates GSK3. *J Neurochem* **78**, 468-81.
- Sansilvestri, P., Cardoso, A.A., Batard, P., Panterne, B., Hatzfeld, A., Lim, B., Levesque, J.P., Monier, M.N. et Hatzfeld, J. (1995) Early CD34^{high} cells can be separated into KIT^{high} cells in which transforming growth factor-beta (TGFbeta) downmodulates c-kit and KIT^{low} cells in which anti-TGFbeta upmodulates c-kit. *Blood* **86**, 1729-35.
- Santos-Garcia, A., Abad-Hernandez, M.M., Fonseca-Sanchez, E., Julian-Gonzalez, R., Galindo-Villardón, P., Cruz-Hernandez, J.J. et Bullón-Sopelana, A. (2006) E-cadherin, laminin and collagen IV expression in the evolution from dysplasia to oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **11**, E100-5.
- Sargiannidou, I., Zhou, J. et Tuszynski, G.P. (2001) The role of thrombospondin-1 in tumor progression. *Exp Biol Med (Maywood)* **226**, 726-33.

- Sarker, K.P., Wilson, S.M. et Bonni, S. (2005) SnoN is a cell type-specific mediator of transforming growth factor-beta responses. *J Biol Chem* **280**, 13037-46.
- Sasaki, T., Gohring, W., Mann, K., Maurer, P., Hohenester, E., Knauper, V., Murphy, G. et Timpl, R. (1997) Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens. *J Biol Chem* **272**, 9237-43.
- Sato, H., Kinoshita, T., Takino, T., Nakayama, K. et Seiki, M. (1996) Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett* **393**, 101-4.
- Sawada, Y., Suda, M., Yokoyama, H., Kanda, T., Sakamaki, T., Tanaka, S., Nagai, R., Abe, S. et Takeuchi, T. (1997) Stretch-induced hypertrophic growth of cardiocytes and processing of brain-type natriuretic peptide are controlled by proprotein-processing endoprotease furin. *J Biol Chem* **272**, 20545-54.
- Sawicki, G., Salas, E., Murat, J., Miszta-Lane, H. et Radomski, M.W. (1997) Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature* **386**, 616-9.
- Schachter, H. (2005) The search for glycan function: fucosylation of the TGFbeta1 receptor is required for receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15721-2.
- Schneller, M., Vuori, K. et Ruoslahti, E. (1997) Alphavbeta3 integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *EMBO J* **16**, 5600-7.
- Schonbeck, U., Mach, F. et Libby, P. (1998) Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* **161**, 3340-6.
- Schottenfeld, D. et Beebe-Dimmer, J. (2006) Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin* **56**, 69-83.
- Schultz-Cherry, S., Chen, H., Mosher, D.F., Misenheimer, T.M., Kruttsch, H.C., Roberts, D.D. et Murphy-Ullrich, J.E. (1995) Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1. *J Biol Chem* **270**, 7304-10.
- Schultz-Cherry, S., Lawler, J. et Murphy-Ullrich, J.E. (1994a) The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **269**, 26783-8.
- Schultz-Cherry, S., Ribeiro, S., Gentry, L. et Murphy-Ullrich, J.E. (1994b)

Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor-beta in a chemically defined system. *J Biol Chem* **269**, 26775-82.

- Schwartz, D.E., Tizard, R. et Gilbert, W. (1983) Nucleotide sequence of Rous sarcoma virus. *Cell* **32**, 853-69.
- Seidah, N.G. et Chretien, M. (1997) Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 602-7.
- Seidah, N.G. et Chretien, M. (1999) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res* **848**, 45-62.
- Sheppard, D. (2005) Integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta. *Cancer Metastasis Rev* **24**, 395-402.
- Sheppard, D. (2001) Integrin-mediated activation of transforming growth factor-beta(1) in pulmonary fibrosis. *Chest* **120**, 49S-53S.
- Sheu, B.C., Hsu, S.M., Ho, H.N., Lien, H.C., Huang, S.C. et Lin, R.H. (2001) A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res* **61**, 237-42.
- Shih, S.C., Ju, M., Liu, N., Mo, J.R., Ney, J.J. et Smith, L.E. (2003) Transforming growth factor beta1 induction of vascular endothelial growth factor receptor 1: mechanism of pericyte-induced vascular survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15859-64.
- Shimizu, K., Bourillot, P.Y., Nielsen, S.J., Zorn, A.M. et Gurdon, J.B. (2001) Swift is a novel BRCT domain coactivator of Smad2 in transforming growth factor beta signaling. *Mol Cell Biol* **21**, 3901-12.
- Siegfried, G., Basak, A., Prichett-Pejic, W., Scamuffa, N., Ma, L., Benjannet, S., Veinot, J.P., Calvo, F., Seidah, N. et Khatib, A.M. (2005) Regulation of the stepwise proteolytic cleavage and secretion of PDGF-B by the proprotein convertases. *Oncogene* **24**, 6925-35.
- Siegfried, G., Khatib, A.M., Benjannet, S., Chretien, M. et Seidah, N.G. (2003) The proteolytic processing of pro-platelet-derived growth factor-A at RRKR(86) by members of the proprotein convertase family is functionally correlated to platelet-derived growth factor-A-induced functions and tumorigenicity. *Cancer Res* **63**, 1458-63.
- Smith, J.W. et Cheresch, D.A. (1990) Integrin (alpha v beta 3)-ligand interaction. Identification of a heterodimeric RGD binding site on the vitronectin receptor. *J Biol Chem* **265**, 2168-72.

- Spector, F.C., Kern, E.R., Palmer, J., Kaiwar, R., Cha, T.A., Brown, P. et Spaete, R.R. (1998) Evaluation of a live attenuated recombinant virus RAV 9395 as a herpes simplex virus type 2 vaccine in guinea pigs. *J Infect Dis* **177**, 1143-54.
- Sporn, M.B. et Todaro, G.J. (1980) Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med* **303**, 878-80.
- Sporn, M. B. (2005) The Early History of TGF β . *Cytokine Bulletin Printemps* **2005**, 1-4.
- Stawowy, P., Margeta, C., Kallisch, H., Seidah, N.G., Chretien, M., Fleck, E. et Graf, K. (2004) Regulation of matrix metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in cardiac fibroblasts by TGF β 1 involves furin-convertase. *Cardiovasc Res* **63**, 87-97.
- Stawowy, P., Meyborg, H., Stibenz, D., Borges Pereira Stawowy, N., Roser, M., Thanabalasingam, U., Veinot, J.P., Chretien, M., Seidah, N.G., Fleck, E. et Graf, K. (2005) Furin-like proprotein convertases are central regulators of the membrane type matrix metalloproteinase-pro-matrix metalloproteinase-2 proteolytic cascade in atherosclerosis. *Circulation* **111**, 2820-7.
- Steiner, D.F. (1998) The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol* **2**, 31-9.
- Stroschein, S.L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q. et Luo, K. (1999) Negative feedback regulation of TGF β signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* **286**, 771-4.
- Stuelten, C.H., DaCosta Byfield, S., Arany, P.R., Karpova, T.S., Stetler-Stevenson, W.G. et Roberts, A.B. (2005) Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF- α and TGF β . *J Cell Sci* **118**, 2143-53.
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K. et Cox, N. (1998) Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* **279**, 393-6.
- Sympson, C.J., Talhouk, R.S., Alexander, C.M., Chin, J.R., Clift, S.M., Bissell, M.J. et Werb, Z. (1994) Targeted expression of stromelysin-1 in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue-specific gene expression. *J Cell Biol* **125**, 681-93.
- Takasawa, S., Ikeda, T., Akiyama, T., Nata, K., Nakagawa, K., Shervani, N.J., Noguchi, N., Murakami-Kawaguchi, S., Yamauchi, A., Takahashi, I., Tomioka-Kumagai, T. et Okamoto, H. (2006) Cyclin D1 activation through ATF-2 in Reg-induced pancreatic beta-cell regeneration. *FEBS Lett* **580**, 585-91.

- Tang, B., Vu, M., Booker, T., Santner, S.J., Miller, F.R., Anver, M.R. et Wakefield, L.M. (2003) TGFbeta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* **112**, 1116-24.
- Taylor, N.A., Van De Ven, W.J. et Creemers, J.W. (2003) Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology. *FASEB J* **17**, 1215-27.
- Ten Dijke, P., Goumans, M.J., Itoh, F. et Itoh, S. (2002) Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* **191**, 1-16.
- Teraoka, H., Sawada, T., Nishihara, T., Yashiro, M., Ohira, M., Ishikawa, T., Nishino, H. et Hirakawa, K. (2001) Enhanced VEGF production and decreased immunogenicity induced by TGFbeta 1 promote liver metastasis of pancreatic cancer. *Br J Cancer* **85**, 612-7.
- Thomas, G. (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 753-66.
- Thomasset, N., Lochter, A., Sympton, C.J., Lund, L.R., Williams, D.R., Behrendtsen, O., Werb, Z. et Bissell, M.J. (1998) Expression of autoactivated stromelysin-1 in mammary glands of transgenic mice leads to a reactive stroma during early development. *Am J Pathol* **153**, 457-67.
- Thraillkill, K.M., Quarles, L.D., Nagase, H., Suzuki, K., Serra, D.M. et Fowlkes, J.L. (1995) Characterization of insulin-like growth factor-binding protein 5-degrading proteases produced throughout murine osteoblast differentiation. *Endocrinology* **136**, 3527-33.
- Todaro, G.J. et De Larco, J.E. (1978) Growth factors produced by sarcoma virus-transformed cells. *Cancer Res* **38**, 4147-54.
- Todaro, G.J. et Huebner, R.J. (1972) N.A.S. symposium: new evidence as the basis for increased efforts in cancer research. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**, 1009-15.
- Tomita, K., van Bokhoven, A., van Leenders, G.J., Ruijter, E.T., Jansen, C.F., Bussemakers, M.J. et Schalken, J.A. (2000) Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res* **60**, 3650-4.
- Tsuneoka, M., Nakayama, K., Hatsuzawa, K., Komada, M., Kitamura, N. et Mekada, E. (1993) Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. *J Biol Chem* **268**, 26461-5.
- Tumbarello, D.A., Brown, M.C., Hetey, S.E. et Turner, C.E. (2005) Regulation of paxillin family members during epithelial-mesenchymal transformation: a putative role for paxillin delta. *J Cell Sci* **118**, 4849-63.

- Turck, J., Pollock, A.S. et Lovett, D.H. (1997) Gelatinase A is a glomerular mesangial cell growth and differentiation factor. *Kidney Int* **51**, 1397-400.
- Uchida, K., Suzuki, H., Ohashi, T., Nitta, K., Yumura, W. et Nihei, H. (2001) Involvement of MAP kinase cascades in Smad7 transcriptional regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 376-81.
- Uhl, M., Aulwurm, S., Wischhusen, J., Weiler, M., Ma, J.Y., Almirez, R., Mangadu, R., Liu, Y.W., Platten, M., Herrlinger, U., Murphy, A., Wong, D.H., Wick, W., Higgins, L.S. et Weller, M. (2004) SD-208, a novel transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor, inhibits growth and invasiveness and enhances immunogenicity of murine and human glioma cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* **64**, 7954-61.
- Van Beek, J.P., Kennedy, L., Rockel, J.S., Bernier, S.M. et Leask, A. (2006) The induction of CCN2 by TGFbeta1 involves Ets-1. *Arthritis Res Ther* **8**, R36
- van de Ven, W.J., Voorberg, J., Fontijn, R., Pannekoek, H., van den Ouweland, A.M., van Duijnhoven, H.L., Roebroek, A.J. et Siezen, R.J. (1990) Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol Biol Rep* **14**, 265-75.
- van der Flier, A. et Sonnenberg, A. (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* **305**, 285-98.
- Van Trappen, P.O. et Pepper, M.S. (2002) Lymphatic dissemination of tumour cells and the formation of micrometastases. *Lancet Oncol* **3**, 44-52.
- Vardouli, L., Moustakas, A. et Stournaras, C. (2005) LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **280**, 11448-57.
- Varon, C., Tatin, F., Moreau, V., Van Obberghen-Schilling, E., Fernandez-Sauze, S., Reuzeau, E., Kramer, I. et Genot, E. (2006) Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells. *Mol Cell Biol* **26**, 3582-94.
- Vassalli, J.D., Sappino, A.P. et Belin, D. (1991) The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest* **88**, 1067-72.
- Verrecchia, F., Tacheau, C., Schorpp-Kistner, M., Angel, P. et Mauviel, A. (2001a) Induction of the AP-1 members c-Jun and JunB by TGFbeta/Smad suppresses early Smad-driven gene activation. *Oncogene* **20**, 2205-11.
- Verrecchia, F., Vindevoghel, L., Lechleider, R.J., Uitto, J., Roberts, A.B. et Mauviel, A. (2001b) Smad3/AP-1 interactions control transcriptional responses to TGFbeta

- in a promoter-specific manner. *Oncogene* **20**, 3332-40.
- Vinals, F. et Pouyssegur, J. (2001) Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGFalpha signaling. *Mol Cell Biol* **21**, 7218-30.
- Visse, R. et Nagase, H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* **92**, 827-39.
- Vodovotz, Y., Chesler, L., Chong, H., Kim, S.J., Simpson, J.T., DeGraff, W., Cox, G.W., Roberts, A.B., Wink, D.A. et Barcellos-Hoff, M.H. (1999) Regulation of transforming growth factor beta1 by nitric oxide. *Cancer Res* **59**, 2142-9.
- Vogelmann, R., Nguyen-Tat, M.D., Giehl, K., Adler, G., Wedlich, D. et Menke, A. (2005) TGFbeta-induced downregulation of E-cadherin-based cell-cell adhesion depends on PI3-kinase and PTEN. *J Cell Sci* **118**, 4901-12.
- Volchkov, V.E., Feldmann, H., Volchkova, V.A. et Klenk, H.D. (1998) Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 5762-7.
- von Gersdorff, G., Susztak, K., Rezvani, F., Bitzer, M., Liang, D. et Bottinger, E.P. (2000) Smad3 and Smad4 mediate transcriptional activation of the human Smad7 promoter by transforming growth factor beta. *J Biol Chem* **275**, 11320-6.
- Vu, T.H. et Werb, Z. (2000) Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* **14**, 2123-33.
- Wahab, N.A., Schaefer, L., Weston, B.S., Yiannikouris, O., Wright, A., Babelova, A., Schaefer, R. et Mason, R.M. (2005) Glomerular expression of thrombospondin-1, transforming growth factor beta and connective tissue growth factor at different stages of diabetic nephropathy and their interdependent roles in mesangial response to diabetic stimuli. *Diabetologia* **48**, 2650-60.
- Wang, H.R., Zhang, Y., Ozdamar, B., Ogunjimi, A.A., Alexandrova, E., Thomsen, G.H. et Wrana, J.L. (2003) Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* **302**, 1775-9.
- Wang, K.S., Hu, Z.L., Li, J.H., Xiao, D.S. et Wen, J.F. (2006) Enhancement of metastatic and invasive capacity of gastric cancer cells by transforming growth factor-beta1. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **38**, 179-86.
- Wang, W., Mariani, F.V., Harland, R.M. et Luo, K. (2000) Ski represses bone morphogenic protein signaling in *Xenopus* and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 14394-9.

- Wang, X., Inoue, S., Gu, J., Miyoshi, E., Noda, K., Li, W., Mizuno-Horikawa, Y., Nakano, M., Asahi, M., Takahashi, M., Uozumi, N., Ihara, S., Lee, S.H., Ikeda, Y., Yamaguchi, Y., Aze, Y., Tomiyama, Y., Fujii, J., Suzuki, K., Kondo, A., Shapiro, S.D., Lopez-Otin, C., Kuwaki, T., Okabe, M., Honke, K. et Taniguchi, N. (2005) Dysregulation of TGFbeta1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15791-6.
- Wasley, L.C., Rehemtulla, A., Bristol, J.A. et Kaufman, R.J. (1993) PACE/furin can process the vitamin K-dependent pro-factor IX precursor within the secretory pathway. *J Biol Chem* **268**, 8458-65.
- Weaver, A.M. (2006) Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clin Exp Metastasis* **23**, 97-105.
- Whitelock, J.M., Murdoch, A.D., Iozzo, R.V. et Underwood, P.A. (1996) The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem* **271**, 10079-86.
- Wilkes, M.C., Mitchell, H., Penheiter, S.G., Dore, J.J., Suzuki, K., Edens, M., Sharma, D.K., Pagano, R.E. et Leof, E.B. (2005) Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. *Cancer Res* **65**, 10431-40.
- Wise, R.J., Barr, P.J., Wong, P.A., Kiefer, M.C., Brake, A.J. et Kaufman, R.J. (1990) Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9378-82.
- Witty, J.P., Wright, J.H. et Matrisian, L.M. (1995) Matrix metalloproteinases are expressed during ductal and alveolar mammary morphogenesis, and misregulation of stromelysin-1 in transgenic mice induces unscheduled alveolar development. *Mol Biol Cell* **6**, 1287-303.
- Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U.H., Deryugina, E.I., Strongin, A.Y., Bocker, E.B. et Friedl, P. (2003) Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* **160**, 267-77.
- Woodward, J.K., Elshaw, S.R., Murray, A.K., Nichols, C.E., Cross, N., Laws, D., Rennie, I.G. et Sisley, K. (2002) Stimulation and inhibition of uveal melanoma invasion by HGF, GRO, IL-1alpha and TGFbeta. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 3144-52.

- Woodward, J.K., Rennie, I.G., Burn, J.L. et Sisley, K. (2005) A potential role for TGFbeta in the regulation of uveal melanoma adhesive interactions with the hepatic endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 3473-7.
- Wotton, D. et Massague, J. (2001) Smad transcriptional corepressors in TGF beta family signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* **254**, 145-64.
- Wu, J.W., Krawitz, A.R., Chai, J., Li, W., Zhang, F., Luo, K. et Shi, Y. (2002) Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGFbeta signaling. *Cell* **111**, 357-67.
- Wyckoff, J.B., Pinner, S.E., Gschmeissner, S., Condeelis, J.S. et Sahai, E. (2006) ROCK- and Myosin-Dependent Matrix Deformation Enables Protease-Independent Tumor-Cell Invasion In Vivo. *Curr Biol* **16**, 1515-23.
- Xu, L., Chen, S. et Bergan, R.C. (2006) MAPKAPK2 and HSP27 are downstream effectors of p38 MAP kinase-mediated matrix metalloproteinase type 2 activation and cell invasion in human prostate cancer. *Oncogene* **25**, 2987-98.
- Yamaguchi, H. et Condeelis, J. (2006) Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta*
- Yamaguchi, H., Pixley, F. et Condeelis, J. (2006) Invadopodia and podosomes in tumor invasion. *Eur J Cell Biol* **85**, 213-8.
- Yamashita, H., Okadome, T., Franzen, P., ten Dijke, P., Heldin, C.H. et Miyazono, K. (1995) A rat pituitary tumor cell line (GH3) expresses type I and type II receptors and other cell surface binding protein(s) for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **270**, 770-4.
- Yan, Z., Winawer, S. et Friedman, E. (1994) Two different signal transduction pathways can be activated by transforming growth factor beta 1 in epithelial cells. *J Biol Chem* **269**, 13231-7.
- Yee, K.O., Streit, M., Hawighorst, T., Detmar, M. et Lawler, J. (2004) Expression of the type-1 repeats of thrombospondin-1 inhibits tumor growth through activation of transforming growth factor-beta. *Am J Pathol* **165**, 541-52.
- Yevdokimova, N., Wahab, N.A. et Mason, R.M. (2001) Thrombospondin-1 is the key activator of TGFbeta1 in human mesangial cells exposed to high glucose. *J Am Soc Nephrol* **12**, 703-12.
- Yokota, J. et Sugimura, T. (1993) Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes. *FASEB J* **7**, 920-5.
- Yu, Q. et Stamenkovic, I. (2000) Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9

proteolytically activates TGFbeta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* **14**, 163-76.

Zaman, M.H., Trapani, L.M., Sieminski, A.L., Mackellar, D., Gong, H., Kamm, R.D., Wells, A., Lauffenburger, D.A. et Matsudaira, P. (2006) Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10889-94.

Zavadil, J. et Bottinger, E.P. (2005) TGFbeta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **24**, 5764-74.

Zhang, F., Lee, J., Lu, S., Pettaway, C.A. et Dong, Z. (2005) Blockade of transforming growth factor-beta signaling suppresses progression of androgen-independent human prostate cancer in nude mice. *Clin Cancer Res* **11**, 4512-20.

Zhang, Q., Yang, X.J., Kundu, S.D., Pins, M., Javonovic, B., Meyer, R., Kim, S.J., Greenberg, N.M., Kuzel, T., Meagher, R., Guo, Y. et Lee, C. (2006) Blockade of transforming growth factor- β signaling in tumor-reactive CD8(+) T cells activates the antitumor immune response cycle. *Mol Cancer Ther* **5**, 1733-43.

Zipori, D. (2004) Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. *Blood Cells Mol Dis* **33**, 211-5.